

Untersuchungen über Zahl, Reaktivität und Funktion von SH-Gruppen an der Oberfläche von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Monika Löffler, geb. Kail
aus Gleiwitz

Marburg/Lahn 1974

Untersuchungen über Zahl, Reaktivität und Funktion von SH-Gruppen an der Oberfläche von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Monika Löffler, geb. Kail
aus Gleiwitz



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/L als Dissertation angenommen am 10.6.1974

Tag der mündlichen Prüfung: 26.6.1974

Dekan:	Prof. Dr. H. Klamberg
Berichterstatter:	Prof. Dr. Fr. Schneider
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Kindl

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter
Leitung von

Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider
im Physiologisch-chemischen Institut II der Philipps-
Universität Marburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider danke ich für die groß-
zügige Förderung meiner Arbeit und für viele anregende
Diskussionen.

Frau R. Sauer danke ich für vorzügliche technische
Assistenz.

Herrn Dr. G. Niebch und Herrn Dr. E. Schaich danke ich
für die freundliche Überlassung spezieller SH-Reagenzien.

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1.	Zellmaterial, Zellzucht in vivo und in vitro	5
2.2.	Quantitative Bestimmung der SH-Gruppen auf der Zelloberfläche	10
2.3.	Methodische Studien zur Bestimmung von SH-Gruppen über Disulfidaustauschreaktion	11
2.3.1.	Einfluß der Reaktionsbedingungen und Reagenzien auf die quantitative Bestimmung	11
2.3.2.	Bestimmung der Glutathionreduktase Aktivität von Zellen	13
2.4.	Messung der Disulfid spaltenden Aktivität der EAT-Zellen	15
2.5.	Übersicht über die Strukturformeln der verwendeten SH-Blocker	17
2.6.	Untersuchung der Reaktivität verschiedener SH-Reagenzien gegenüber niedermolekularen SH-Verbindungen	18
2.7.	Messung des Einflusses von SH-Reagenzien auf den Zellstoffwechsel	19
2.8.	Messung des Einflusses von SH-Reagenzien auf den intrazellulären SH Spiegel	21
2.8.1.	Wirkung auf den Nicht-Protein-SH Gehalt	21
2.8.2.	Wirkung auf die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase	24
2.9.	Untersuchungen über die SH-Funktionen der Zelloberfläche	26
2.9.1.	Bestimmung membrangebundener Enzymaktivitäten	30
2.9.2.	Wirkung von Dithioerythrit und Neuraminidase auf die Zahl der Oberflächen-SH-Gruppen	32
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	35
3.1.	Zahl der SH-Gruppen auf der Oberfläche von EAT-Zellen	35
3.2.	Kritik der Grassetti-Methode zur Bestimmung der SH-Gruppen an Zelloberflächen	36
3.2.1.	Einfluß der Reaktionsbedingungen und der Art des Reagenzes auf die quantitative Bestimmung	36

	Seite
3.2.2. Glutathionreduktase Aktivität von EAT-Zellen	43
3.2.3. Diskussion	46
3.3. Reduktion verschiedener Disulfide durch intakte Zellen	52
3.3.1. Diskussion	55
3.4. Reaktivität verschiedener SH-Reagenzien gegenüber niedermolekularen Mercaptanen	60
3.4.1. Diskussion	61
3.5. Einfluß verschiedener SH-Reagenzien auf den Zellstoffwechsel	63
3.5.1. Diskussion	68
3.6. Beeinflussung des intrazellulären SH Spiegels durch SH-Reagenzien	71
3.6.1. Nicht-Protein-SH Gehalt	71
3.6.2. Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase	73
3.6.3. Diskussion	74
3.7. Auswirkungen von SH-Blockern auf die SH-Gruppen der Zelloberfläche	78
3.7.1. Diskussion	81
3.8. Membrangebundene SH-Enzyme	85
3.8.1. Diskussion	89
3.9. Wirkung von Dithioerythrit und Neuraminidase auf Zahl und Reaktivität der SH-Gruppen	93
3.9.1. Diskussion	95
4. SCHLUSSBETRACHTUNG	99
5. ZUSAMMENFASSUNG	109
6. LITERATURVERZEICHNIS	113

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP-ase	Adenosintriphosphatase
BAAIP	Bromacetyl-5-amino-isophtalsäure
BASS	4-Bromacetylsulfanilsäure
CAAIP	Chloracetyl-5-amino-isophtalsäure
Cys	Cystein
pCMB	p-Chlormercuribenzoessäure
pCMBs	p-Chlormercuriphenylsulfonsäure
CPDS	6,6'-(3,3'-Carboxypyridin)-disulfid
CPT	Carboxypyridinthion
DTE	1,4-Dithioerythrit
EAT	Ehrlich-Ascites-Tumor
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoessäure)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)
GR	Glutathionreduktase (EC 1.6.4.2.)
GSSG	Glutathion oxidiert
GSH	Glutathion reduziert
JAA	Jodacetamid
JAC	Jodacetat
MC	Mercurochrom (2,7-dibrom-4-hydroxymercuri- fluorescein)
MEID	5-(β -mercaptoäthyl)-imidazoldisulfid
MEMID	5-(β -mercaptoäthyl)-1-methyl-imidazoldisulfid
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (red.)
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NCPM	N-Carboxyphenylmaleinimid
NEM	N-Äthylmaleinimid
NPM	N-Phenylmaleinimid
NiPM	N-isq-Phenylmaleinimid
pNP	p-Nitrophenol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
pNPP-ase	p-Nitrophenylphosphatase
NPSH	Nicht-Protein-SH
PCA	Perchlorsäure

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Jede Zelle ist von einer Membran umhüllt, über die sie mit ihrer Umwelt in Kontakt tritt. Eine der wichtigsten Funktionen der äußeren Membranen ist neben der Aufrechterhaltung eines konstanten Milieus in der Zelle die Vermittlung von Veränderungen im umgebenden Milieu sowie die Übertragung spezifischer Reize von außen in das Innere der Zelle.

Viele Probleme der Zellbiologie sind eng mit Veränderungen verbunden, die sich während der Zelldifferenzierung im normalen und pathologischen Geschehen an der Zelloberfläche abspielen. Gemessen an ihrer Bedeutung für Stofftransport, Informationsaustausch und Kontrolle des Zellwachstums sind unsere Kenntnisse über die molekulare Architektur der Zellmembran und ihre Beziehungen zur Funktion noch sehr lückenhaft. Wir wissen zwar, daß Proteine, Glykoproteine, Lipoproteine, Glykolipide und Phospholipide integrale Bestandteile aller Membranen sind [1,2], wir kennen aber die Funktionen dieser Komponenten in der Membran ebensowenig wie ihre genaue Anordnung.

Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen die Gegenwart eines Mantels an der Außenseite der Plasmamembran, bestehend aus verlängerten Glykoprotein- und Glykolipidmolekülen (Glykokalyx), die mit ähnlichen Molekülen der benachbarten Zellen in Wechselwirkung treten können [3].

In dem allgemeinsten Modell der äußeren Membran menschlicher oder tierischer Zellen befinden sich nach neueren Erkenntnissen [4] Proteine, Glykoproteine und Glykolipide eingebettet in eine flüssig-kristalline Phospholipid-Doppelschicht, also einer im partiell geschmolzenen Zustand befindlichen Phospholipidschicht, in der nicht

nur die Phospholipide beweglich sind, sondern auch die einzelnen globulären Proteinbezirke.

Im Gegensatz zu allen früheren Betrachtungsweisen sieht man heute die Zellmembran nicht nur im Hinblick auf ihren Stoffwechsel, sondern auch auf die Anordnung ihrer Strukturelemente als dynamisch an. Bei Untersuchungen der Funktion von Membrankomponenten in Prozessen, die an der Zelloberfläche ablaufen, ist daher die bloße Menge und die Zugänglichkeit der Komponenten weniger relevant als ihre aktuelle Lokalisation auf der Membran oder die Verteilung in den Membranelementen.

Neben den Lipidbestandteilen sind die Kohlenhydrate der Glykolipide und Glykoproteine der Zelloberfläche am besten untersucht. Wir wissen heute, daß sie die determinanten Gruppen für immunologische Vorgänge sind und etwas mit der Zellerkennung zu tun haben [1, 5]. Neben den Oligosacchariden befinden sich Proteine an der Zelloberfläche, die Träger verschiedener funktioneller Gruppen wie Carboxyl-, Phosphat-, Sulfhydryl- und Amino-
gruppen sind. Die SH-Gruppen sind besonders interessant, weil sie als reaktivste Gruppen der Proteine zu verschiedenen Umsetzungen, wie z.B. Bildung von Disulfiden oder Thioäthern in der Lage sind. Es wird angenommen [3], daß die chemische Ausprägung der Zelloberfläche vom metabolischen Zustand der Zelle abhängig ist, und daß somit eine physiologische Kontrolle der Membranstruktur besteht. Infolgedessen sollten sich Reaktivität und Zahl bestimmter funktioneller Gruppen mit dem Zustand der Zelle ändern, z.B. in den verschiedenen Teilungsstadien, beim Wechsel des Milieus oder der Temperatur und bei schwerwiegenden Eingriffen in den Energiestoffwechsel wie der Übergang von Aerobiose zu Anaerobiose. Umgekehrt könnten Modifizierungen von funktionellen Gruppen der Plasmamembran Veränderungen im Zellstoffwechsel herbeiführen.

Als Parameter für Änderungen der Oberflächenstruktur der Membranproteine sollte sich die Zahl und Reaktivität von SH-Gruppen eignen, für deren Nachweis verschiedene Methoden existieren. Man muß für solche Untersuchungen die Membraneigenschaften an lebenden Zellen studieren, da die Isolierung von Komponenten in den meisten Fällen höchst wahrscheinlich zu Veränderungen empfindlicher Strukturcharakteristika der Membranbestandteile führt [1]. Bei der Untersuchung und Interpretation von Zahl und Zugänglichkeit charakteristischer Oberflächenkomponenten und ihren Beziehungen zum metabolischen Zustand der Zelle sowie zu den Milieubedingungen, muß man allerdings die "Plastizität" der Zelloberfläche berücksichtigen.

FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Problem der Reaktivität, Zahl und Funktion der SH-Gruppen in den Proteinen der Plasmamembran lebender Ehrlich-Ascites-Tumorzellen liefern.

Zu diesem Zweck wird zunächst geprüft, ob die Bestimmung der Zahl und Reaktivität von SH-Gruppen ein geeigneter Parameter zur Verfolgung von Änderungen der chemischen Ausprägung der Zelloberfläche unter verschiedenen Bedingungen darstellt.

Es werden daher einige bekannte SH-Reagenzien auf ihre Eignung zur quantitativen Bestimmung der SH-Gruppen an der Zelloberfläche verglichen und die dazu vorliegenden Untersuchungen und Ergebnisse der Literatur einer kritischen Analyse unterzogen. Ferner wird in einigen grundlegenden Experimenten versucht, eine Aussage über die Disulfidspaltende Kapazität der intakten EAT-Zelle zu machen, da die am meisten zur quantitativen Bestimmung von SH-Gruppen verwendeten Reagenzien ihrer chemischen

Natur nach zu den Disulfiden gehören. Weitere Untersuchungen befassen sich mit der Frage, ob direkte Eingriffe in die Oberflächenstruktur durch chemische oder enzymatische Modifizierung zu drastischen Veränderungen in der Zahl und Zugänglichkeit von Oberflächen-SH-Gruppen führen.

Weiterhin ist die Frage, in welchem Ausmaß Alkylierungsmittel, Maleinimide und Quecksilberorganische Verbindungen, die zur Blockierung intrazellulärer SH-Enzyme und niedermolekularer SH-Verbindungen verwendet werden, bereits mit Oberflächen-SH-Gruppen reagieren, Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, wie sich eine teilweise oder auch totale Blockierung dieser Oberflächen-SH-Gruppen auf die Vitalität, den Stoffwechsel und die Vermehrung der Zellen auswirkt. Für diese Untersuchungen werden auch neu eingeführte Alkylierungsreagenzien verwendet, die mit SH-Gruppen stabile Thioätherbindungen bilden und nach Möglichkeit nicht in die Zellen eindringen.

Bei all diesen Problemen spielt die Permeabilität der Plasmamembran für die verwendeten Reagenzien eine entscheidende Rolle. Dieser Frage wird daher besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellmaterial, Zellzucht in vivo und in vitro

Für alle Experimente wurden hyperdiploide, permanent in vitro züchtbare Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach KARZEL [6] verwendet. Die Tumorzellen wurden in der Bauchhöhle weißer weiblicher NMRI Mäuse (20 - 25 g; Versuchstieranstalt Ivanovas Kisslegg) angezüchtet. Einer gesunden Maus wurden 0,2 ml eines 8 - 9 Tage alten Ascites intraperitoneal gespritzt.

Für einige Untersuchungen wurden die Zellen 15 Stunden in einem sterilen Kulturmedium bei 37°C angezüchtet. Anschließend erfolgte Mediumwechsel. Zu definierten Zeitpunkten wurden in der 2. Passage in vitro Proben entnommen.

Anlage einer Kultur

Das Kulturmedium entspricht in seiner Zusammensetzung den Angaben von SCHINDLER [7] und KRAUSE [8]; es besteht zu 15 % aus Pferdeserum^{*)}. Da das fertige Medium nur etwa 14 Tage bei 4°C haltbar ist, wurden sterile Stammlösungen der einzelnen Komponenten eingelagert, bei Bedarf zusammengegeben und über Seitz Filter EKS sterilfiltriert. Das vom Blutkuchen abgepreßte Pferdeserum wurde zentrifugiert und über Seitz Filter EKS II sterilfiltriert.

Am 5. - 7. Tag nach Inokulation der Tumorzellen wurde die Maus getötet, 0,5 ml Ascites-Zellsuspension abpunktiert und zur Verhinderung der Gerinnung möglichst schnell in 100 ml Kulturmedium von 37°C gespritzt. Aus der gründlich

^{*)} Wir danken den BEHRINGWERKEN, Marburg, für die freundliche Überlassung des Pferdeserums

durchgemischten Kultur wurde steril 1 ml zur Bestimmung der Zelldichte entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3 min bei 500 g), das Medium bis auf 10 ml abgegossen; die Zellen wurden darin resuspendiert, ein Teil davon zu 100 ml angewärmtem Medium gegeben, so daß eine Zelldichte von $5 - 6 \times 10^5$ Zellen/ml resultierte.

Zellen in Pufferlösung

Die Mehrzahl der Experimente wurde mit Zellen durchgeführt, die aus der Maus direkt in 37°C warmes Kulturmedium überführt und nach Abzentrifugieren mehrmals mit warmer Hanks-Pufferlösung gewaschen wurden. Bei einer Versuchsserie wurde ebenso mit Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer gearbeitet. Das erste Aufnehmen in Medium verhindert eine Agglutination der Zellen, die bei direkter Überführung des Ascites von der Maus in den Puffer manchmal zu beobachten ist.

Hankslösung [9]:

NaCl	8,0 g / L
KCl	0,4 g / L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,185 g / L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g / L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,06 g / L
KH_2PO_4	0,06 g / L
Glucose	1,0 g / L
NaHCO_3	0,35 g / L

Die Lösung hat einen pH-Wert von 7.4 .

Der Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer, der die gleichen Salze (weniger Phosphat, mehr Bicarbonat), jedoch keine Glucose enthält, wurde auf pH 7,4 eingestellt [9]. Für verschiedene Untersuchungen war es notwendig, die Zellen in speziellen Puffern zu inkubieren. Es wurde dann

darauf geachtet, daß bei den Waschvorgängen so weit wie möglich Hankslösung verwendet wurde. Aufgrund des optimalen Salzangebots und der anwesenden Glucose, halten sich die Zellen darin wesentlich besser als in Pufferlösungen. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen immer im 37°C warmen Wasserbad inkubiert.

Bestimmung der Zellzahl

Drei Verfahren wurden zur Bestimmung der Zelldichte angewandt:

a) NEUBAUER-Zählkammer

Die Zählung wird mikroskopisch durchgeführt. Um genaue, reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, müssen sehr viele Zellen ausgezählt werden, nach [10] bis zu 1 000 Zellen. Eine einmalige Bestimmung ist daher mit großer Unsicherheit verbunden und mit einem Fehler von $\pm 10\%$ [10] behaftet. Das Auszählen in der Kammer wurde daher nur zur Herstellung von Eichkurven für die Trübungsmessung verwendet und bei einigen Versuchen zusammen mit der Trübungsmessung und der Bestimmung im Celloscope durchgeführt, um die erhaltene Zellzahl abzusichern.

b) Celloscope 202 (Fa. Ljungberg, Stockholm)

Hier wird mit einem elektronischen Zählgerät gearbeitet, bei dem als Zählimpuls die Widerstandsänderung registriert wird, die auftritt, wenn eine Zelle durch eine stromdurchflossene Kapillare gesaugt wird.

Die Zellsuspension wurde mit Hankslösung so verdünnt, daß sie etwa 3×10^4 Zellen/ml enthielt. Es wurde dreimal ausgezählt.

Die Abweichungen betrugen $\pm 5\%$ innerhalb einer Probe. Für Routinebestimmungen dauerte auch dieses Verfahren zu lange, da die Kapillare häufig verstopfte.

c) Trübungsmessung

Die Trübungsmessung wurde von WURSTER [10] als Methode zur Bestimmung der Zelldichte eingehend untersucht. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen Zelldichte, die in der Zählkammer bestimmt wurde und der Extinktion der Probe bei 578 nm im Bereich ΔE bis 0,650. Die Trübungsmessung versagt, wenn sich die Größe der Zellen ändert. Da dies schon durch Änderung der Milieubedingungen eintreten kann, wurde eine Eichkurve für Zellen in Kulturmedium aufgestellt und eine zweite für Zellen, die mehrmals in Hankslösung gewaschen worden waren. Die Extinktion für die gleiche Anzahl mit Hankslösung gewaschener Zellen war um ca. 20 % niedriger als die von Zellen in Medium.

Für die Messung wurde im Eppendorf Photometer (Photozelle 90 s, Spalt 2,5 x 12, Halbmikroküvetten) die Extinktion bei 578 nm einer homogenen Zellsuspension (10 sec Whirlmix) gegen einen Medium- oder Puffer-Leerwert gemessen. Das Verfahren läßt sich äußerst schnell durchführen und gestattet eine ausreichend genaue Bestimmung der Zelldichte. Es wurde bei fast allen Untersuchungen angewandt.

Bestimmung der Zahl toter Zellen

Zur Beurteilung der Auswirkungen von Kulturbedingungen, Pufferbehandlung und Reagenzien auf die Vitalität ist die Bestimmung der Zahl der toten Zellen notwendig. Diese wurde nach der Nigrosin Methode von KALTENBACH et al. [11] durchgeführt. Als kolloidaler Farbstoff dringt Nigrosin nur in eine Zelle ein und färbt Bestandteile des Zellinneren an, wenn die Membran geschädigt ist. Angefärbte Zellen gelten als tot.

Die Proben wurden zur Ermittlung der Zelldichte mit Hankslösung auf 10 ml aufgefüllt, bei 500 g abzentrifugiert und in 0,5 % Nigrosin-Ringerlösung aufgenommen. Man ließ 5 Minuten stehen und zählte die toten Zellen in der Neubauer-Zählkammer aus.

Normaler Ascites aus der Maus und der Zellkultur enthielt in der Regel nicht mehr als 2 - 4 % tote Zellen. Mehrmaliges Waschen und Abzentrifugieren der Zellen bei 500 g in Pufferlösung erhöhte den Anteil toter Zellen.

Zellaufschluß

Für die Bestimmung von intrazellulären Metaboliten und Enzymaktivitäten wurde das Zellmaterial durch Ultraschallbehandlung zerstört.

Die Zellen wurden in 2 ml des entsprechenden Puffers aufgenommen und im Eisbad mit dem Branson Sonifier beschallt (Mikrospritze, Stufe III, 2 x 5 sec).

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Proben mit intakten oder beschallten Zellen wurde nach der Mikrobiuret-Methode [12] bestimmt.

Testansatz:	Probe	0,10 ml
	NaOH	1,00 ml
	Benedict-Reagenz	0,05 ml

Nach 15 Minuten wurde die Extinktion der Probe gegen einen Leerwert mit 0,1 ml Wasser bei 330 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichkurve (Rinderserumalbumin 0,1 - 0,5 mg) ermittelt.

Das Zellmaterial wurde entweder direkt in NaOH gelöst oder zuerst mit Perchlorsäure (Merck p.a., Endkonzentration 0,33 N) ausgefällt. Bei beiden Arbeitsgängen erhielt man, wie auch in [13] berichtet wird, einen Proteingehalt von 200 µg für 10^6 Zellen.

2.2. Quantitative Bestimmung der SH-Gruppen auf der Zelloberfläche

a) mit Carboxypyridindisulfid

Die von GRASSETTI [14] eingeführte Methode beruht auf der Reaktion freier SH-Gruppen der Zelloberfläche mit Carboxypyridindisulfid unter Bildung eines gemischten Disulfids. Dieses wird nach Behandlung der Zellen mit einem Mercaptan unter Freisetzung des Carboxypyridinthions gespalten, das sich spektroskopisch nachweisen läßt.

Reagenzien: Carboxypyridindisulfid 1 mM in Hankslösung
Cystein 2 mM in Hankslösung

Durchführung:

Zellen eines 9 Tage alten Ascites wurden dreimal gewaschen; anschließend wurden $1,7 - 2,0 \times 10^8$ Zellen mit $6 - 7 \mu\text{Mol CPDS}^*)$ in einem Gesamtvolumen von 8 ml 5 Minuten bei 37°C inkubiert, danach dreimal mit je 30 ml Hankslösung gewaschen. Die Zellen wurden in 5 ml Cysteinlösung aufgenommen und 30 Minuten inkubiert. Die Extinktion des auf 100°C erhitzten und abzentrifugierten Zellüberstandes wurde gegen den Überstand einer gleich behandelten Kontrolle bei 344 nm gemessen. Die SH-Konzentration wurde mit dem von GRASSETTI angegebenen Extinktionskoeffizienten von $1,0 \times 10^4 \text{ L/Mol} \cdot \text{cm}$ errechnet.

b) mit Mercurochrom

Mercurochrom reagiert mit SH-Gruppen unter Bildung eines gefärbten Mercaptids. Da sich die Mercaptidbindung in Proteinen durch Zugabe von SH-Verbindungen wie z.B. Cystein wieder spalten läßt, wurde über eine Mercaptidbildung

^{*)} Herrn Dr. E. Schaich danken wir für die Synthese

eine quantitative Bestimmung von SH-Gruppen der Zelloberfläche versucht. Mercurochrom hat ein charakteristisches, scharfes Absorptionsmaximum bei 510 nm. In Hankslösung wurde ein Extinktionskoeffizient von $5,77 \times 10^4$ L/Mol·cm bestimmt.

Reagenzien: Mercurochrom (Krewel, Köln) 0,025 mM in Hankslösung
Cystein 2 mM in Hankslösung

Durchführung:

Die Zellen wurden wie unter a) angegeben mit den Reagenzien behandelt.

2.3. Methodische Studien zur Bestimmung von SH-Gruppen über Disulfidaustauschreaktionen

2.3.1. Einfluß der Reaktionsbedingungen und Reagenzien auf die quantitative Bestimmung

a) Quantitative Bestimmung mit DTNB

Um festzustellen, ob das von GRASSETTI eingeführte CPDS durch ELLMAN-Reagenz, DTNB [15] ersetzt werden kann, wurden parallel Zellen der gleichen Charge mit CPDS und mit DTNB behandelt, wie unter 2.2.a angegeben. Die SH-Konzentration wurde mit dem von ELLMAN angegebenen Extinktionskoeffizienten von $1,36 \times 10^4$ L/Mol·cm errechnet.

b) Einfluß der Temperatur

Der Versuch wurde im Prinzip wie unter 2.2.a. angegeben durchgeführt, jedoch betrug die Temperatur während des Versuchs, d.h. vom Auswaschen der Zellen bis zur Cystein-₀behandlung, in einer Serie 12°C in einer zweiten Serie 25 C.

c) Abspaltung des Thiols mit und ohne Cystein

Der Versuch wurde wie unter 2.2.a. angegeben durchgeführt, jedoch wurde ein Teil der mit CPDS behandelten Zellen wie vorher mit Cystein inkubiert, ein Teil mit reiner Hanks-Lösung. Nach 0, 5, 15, 30, 45 Minuten wurde eine Probe zur Bestimmung der E 344 nm entnommen.

d) Variation des Puffers

Bei dieser Serie wurde ein Teil der Asciteszellen, die wie üblich in Kulturmedium aufgenommen waren, während aller Waschvorgänge und während der Inkubationen in Krebs-Ringer-Bicarbonat gehalten. Die Abspaltung des Thiols wurde wie im Ansatz c) mit und ohne Cystein verfolgt.

e) Analyse der Waschwässer

Die Zellen wurden wie unter 2.2.a. angegeben mit CPDS behandelt, jedoch mit je 10 ml Hankslösung fünfmal gewaschen. Einen Teil der nach Abzentrifugation der Zellen erhaltenen Überstände wurde auf 100°C erhitzt; anschließend wurde anhand der E 344 nm überprüft, ob Reste des hitzelabilen CPDS vorhanden waren. Von den übrigen Proben wurden Spektren im Bereich von 400 - 250 nm angefertigt.

f) Inkubation von Zellen mit DTNB und CPDS über längere Zeit mit und ohne Zusatz von reduzierten Pyridin-nukleotiden und GSSG

2×10^8 Zellen/10 ml wurden 30 Minuten mit 0,75 mM DTNB bzw. CPDS Lösung inkubiert. Zum Zeitpunkt 5, 15, 30 Minuten wurden Proben genommen. Die Extinktion der Überstände wurde gegen einen Blindwert mit der gleichen Menge Reagenz gemessen, der über dieselbe Zeit inkubiert worden war.

Der gleiche Versuch wurde in Gegenwart von 0,5 mM GSSG, 0,5 mM NADH, 0,5 mM NADPH, 0,5 mM GSSG + 0,5 mM NADPH durchgeführt.

2.3.2. Bestimmung der Glutathionreduktaseaktivität von Zellen

a) Ermittlung der Michaeliskonstanten der GSSG-Reduktase für DTNB

Prinzip:

Glutathionreduktase reduziert GSSG mit NADPH.

Es wurde gefunden [16], daß dieses Enzym nicht spezifisch für GSSG ist und auch andere Disulfide umsetzt.

Reagenzien: Glutathionreduktase aus Hefe 1 mg/ml (Boehringer)
DTNB 1 mM
EDTA 10 mg/ml
NADPH 8,5 mM

Testansatz:	Puffer	0,90 ml
[17]	DTNB	0,10 ml
	EDTA	0,05 ml
	Enzym	0,01 ml

Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,020 ml NADPH-Lösung gestartet, die Extinktionszunahme bei 412 nm von einem Schreiber aufgezeichnet.

Für einen Konzentrationsbereich von 0,09 - 0,9 mM DTNB wurden die Anfangsgeschwindigkeiten aufgenommen und K_m nach Lineweaver-Burk ermittelt.

b) Bestimmung der Glutathionreduktaseaktivität im Zellhomogenat

Reagenzien: DTNB 10 mM;
GSSG 10 mM
NADPH 8,5 mM alle in Phosphat-Puffer

Durchführung:

3×10^7 Zellen wurden in 2 ml Phosphat-Puffer, der 5 mg/ml EDTA enthielt, beschallt.

Testansatz:	Puffer	0,8 ml
	Zellaufschluß	0,1 ml
	Disulfid	0,1 ml

Nach 10 Minuten wurde durch Zugabe von 10 µl NADPH-Lösung die Reaktion gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 340 nm bzw. die Zunahme bei 412 nm verfolgt.

c) Messung der Glutathionreduktaseaktivität an der Zelloberfläche

Reagenzien: GSSG 0,5 mM (I)
GSSG 10 mM (II)
NADPH 2 mM
DTNB 2 mM
alle in Hankslösung

Durchführung:

1×10^8 Zellen wurden zusammen mit 2 ml Hankslösung, 7,5 ml GSSG-Lösung (I) und 0,5 ml NADPH-Lösung 10 Minuten inkubiert - die Kontrolle in 10 ml Hankslösung. Nach Abzentrifugieren (4 min bei 500 g) wurde der Überstand der Proben direkt enteiweißt und neutralisiert. 3 ml des Kontrollüberstandes wurde mit 120 µl GSSG-Lösung (II) und 170 µl NADPH-Lösung 10 Minuten bei 37°C und 4 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend enteiweißt und neutralisiert. 3 ml des neutralisierten Überstandes aller Proben wurden mit 0,1 ml DTNB-Reagenz versetzt, 7 Minuten stehengelassen und bei 412 nm gegen einen Leerwert aus 3 ml Puffer und 0,1 ml DTNB-Reagenz gemessen. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnten die Extinktionen der unterschiedlich behandelten Proben direkt miteinander verglichen werden.

d) Wirkung von Glutathionreduktase und NADPH auf die
Abspaltung des CPT von der Zelloberfläche

Durchführung:

Die Zellen wurden wie unter 2.2.a. angegeben mit CPDS behandelt. Zur Reduktion des gemischten Disulfids zwischen Zelloberfläche und Reagenz wurden 2×10^8 Zellen / 5 ml statt mit Cystein 15 Minuten mit Hankslösung bzw. 15 Minuten mit 0,3 mM NADPH und 10 μ l Glutathionreduktase (Stammsuspension 1 mg/ml) inkubiert.

2.4. Messung der Disulfid spaltenden Aktivität der
EAT-Zellen

a) Reduktion von Disulfiden durch intakte Zellen

Reagenzien: Cystein, Cystamin (Merck f. biochem. Zwecke)
GSSG (Boehringer)
DL- α -Liponsäure (Serva, pharm.)
5-(β -mercaptoäthyl)-imidazoldisulfid
5-(β -mercaptoäthyl)-1-methyl-imidazoldisulfid *)
alle 0,5 mM in Phosphatpuffer
NADH, NADPH 1 mM
DTNB 2 mM
Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,5

Durchführung:

1×10^8 gewaschene Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 5 ml mit je 0,2 mM Disulfid 15 Minuten inkubiert, danach abzentrifugiert.

Nach Enteiweißung der Überstände mit PCA wurde der Nicht-Protein-SH Gehalt bestimmt (siehe auch 2.8.1.)

b) Reduktion von Disulfiden durch Zellhomogenat

Die gewaschenen Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Ein Homogenat aus 5×10^7 Zellen wurde in einem Gesamtvolumen von 5 ml mit je 0,2 mM Disulfid

*) Herrn Dr. E. Schaich danken wir für die Synthese dieser Verbindungen

15 Minuten inkubiert. Cystin, Cystamin und GSSG wurden in einem Parallelansatz mit einem Homogenat inkubiert, das 5 Minuten auf 100°C erhitzt worden war. Für Cystin und Cystamin wurde ein weiterer Test zusammen mit 0,2 mM NADPH bzw. NADH angesetzt. In dem mit Cystin inkubierten Zellhomogenat wurde mit Hilfe des Glyoxalasetests die Konzentration des freien GSH gemessen.

Prinzip: [18]

GSH wird mit Methylglyoxal durch die Glyoxalase I zu S-Lactoyl-Glutathion umgesetzt, das bei 240 nm direkt gemessen wird.

Reagenzien: Glyoxalase I 1 mg/ml (Boehringer)
Methylglyoxal 0,17 M (Fluka techn., durch
Destillation bei 18 Torr gereinigt)
Rinderserum-Albumin 1 % in Wasser
Phosphat-Puffer 0,15 M pH 7,5

Testansatz:	Probelösung	1,00	ml
	Puffer	1,00	ml
	Albumin	0,10	ml
	Glyoxalase I	0,01	ml

Nach gründlichem Durchmischen wurde E_1 abgelesen. Nach Zugabe von 0,02 ml Methylglyoxallösung wurde die Extinktion 16 Minuten verfolgt und durch Extrapolation auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe E_2 bestimmt. Die erneute Zugabe von 0,02 ml Methylglyoxal ergab E_3 .

Berechnung: $E_3 - E_2 = \Delta E \text{ Methylglyoxal}$
 $E_2 - E_1 - \Delta E_M = \Delta E \text{ GSH}$

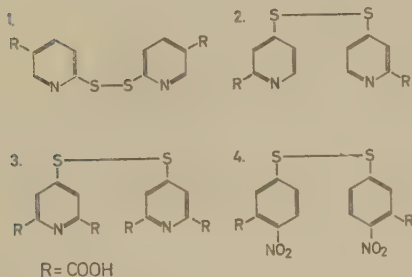
c) Permeationsverhalten von Mercaptanen und Disulfiden

$1,5 \times 10^8$ Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 4 ml 15 Minuten inkubiert mit:

- A) Cystein, GSH, 0,05 mM
- B) GSSG, Cystin, MEID, 0,25 mM
- C) Cystin 0,25 mM + GSH 0,05 mM

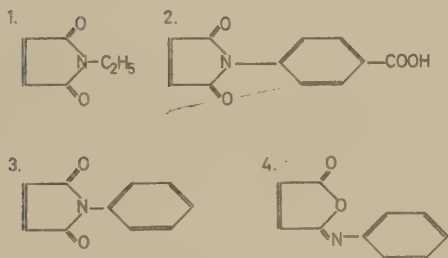
Die Zellen wurden durch Waschen mit Puffer von den Reagenzien befreit und durch Ultraschall aufgeschlossen. Der intrazelluläre NPSH Spiegel wurde mit DTNB bestimmt; zusätzlich wurde der NPSH Gehalt der Inkubationsüberstände gemessen.

2.5. Übersicht über die Strukturformeln der verwendeten SH-Blocker



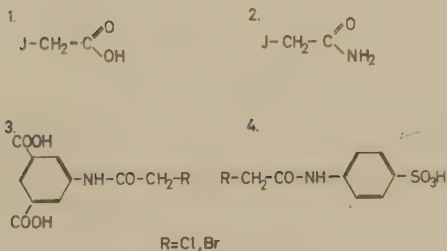
Disulfide

1. 6,6'-CPDS
2. 4,4'-CPDS
3. 4,4'-tetra-CPDS
4. DTNB



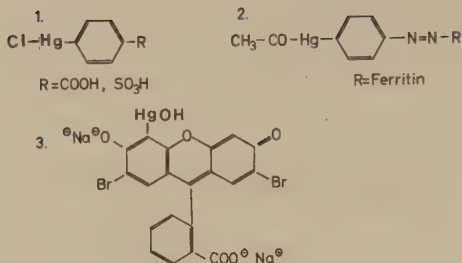
Maleinimide

1. NEM
2. NCPM
3. NPM
4. NiPM



Alkylierungsmittel

1. JAC
2. JAA
3. CAAIP, BAAIP
4. BASS



Quecksilberverbindungen

1. pCMB, pCMBS
2. Acetoxy-mercuri-phenyl-Azoferritin
3. Mercurochrom

2.6. Untersuchung der Reaktivität verschiedener SH-Reagenzien gegenüber niedermolekularen SH-Verbindungen

Formelübersicht siehe Seite 17

a) Disulfide

Reagenzien: 6,6'-(3,3'-Carboxypyridin)-disulfid
 4,4'-(2,2'-Carboxypyridin)-disulfid *)
 4,4'-(2,2'-6,6'-Carboxypyridin)-disulfid *)
 Cystein, Glutathion
 Sörensen Phosphat-Puffer 0,066 M, pH 7,5

Messansatz:

In einer Küvette wurden die Disulfide mit Cystein bzw. Glutathion im Molverhältnis 50 : 1 gemischt und die zeitliche Änderung der Extinktion bei 344 nm verfolgt.

b) Maleinimide und Alkylierungsmittel

Alle Phenylmaleinimide zeigten im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 260 nm. Bei Zugabe von äquimolaren Mengen Cystein beobachtet man eine zeitabhängige Erhöhung der Absorption, die sich aber zur quantitativen Konzentrationsbestimmung freier SH-Gruppen nicht auswerten ließ.

*) Herrn Dr. G. Niebch danken wir für die Synthese dieser Verbindungen

Die Abnahme der freien SH-Gruppen war spektroskopisch ebenfalls nicht erfaßbar. Die Umsetzung aller Reagenzien mit SH-Verbindungen ließ sich jedoch verfolgen, indem die noch nicht verbrauchten SH-Gruppen mit CPDS umgesetzt wurden.

Reagenzien: Cystein und Glutathion 1 mM
CPDS 2 mM
N-Carboxyphenylmaleinimid, N-Phenylmaleinimid *)
N-iso-Phenylmaleinimid *)
Chloracetyl-5-amino-isophtalsäure *)
Bromacetyl-5-amino-isophtalsäure *)
Bromacetyl-sulfanilsäure *)
Jodessigsäure, Jodacetamid (Fluka, pur.)
alle 3 mM in Sörensen Phosphat-Puffer pH 7,5

Testansatz: Cystein (GSH) 0,5 ml
Reagenz 9,5 ml

Von den Ansätzen mit Maleinimiden wurde alle 15 Sekunden, von den anderen alle 30 Sekunden 1 ml Probe genommen und zu 0,5 ml CPDS gespritzt. Die bei 344 nm gemessene Extinktion zeigte die noch nicht umgesetzten freien SH-Gruppen an.

Obwohl die Maleinimide eine Eigenabsorption bei 344 nm zeigen und die Verwendung von Dithiodinitrobenzoesäure zur SH-Bestimmung sinnvoll gewesen wäre, wurde trotzdem mit Carboxypyridindisulfid gearbeitet, da keine Folge-reaktion des entstehenden Carboxypyridinthions mit den noch anwesenden Maleinimiden beobachtet wurde.

2.7. Messung des Einflusses von SH-Reagenzien auf den Zellstoffwechsel

Die Vitalität der Zellen und verschiedene Parameter des Stoffwechsels wurden nach Vorbehandlung mit SH-Blockern

*) Herrn Dr. G. Niebch danken wir für die Synthese dieser Verbindungen

untersucht.

Reagenzien:	SH-Blocker	Endkonzentration mM für	
		Vitalität	Stoffwechsel
	CPDS/DTNB	0,75 - 1,5	0,75 - 1,5
	NCPM	0,375 - 0,800	0,375
	BASS	1,6 - 8,0	1,6 - 8,0
	MC	0,008 - 0,160	0,008; 0,016

a) Behandlung der Zellen

4×10^7 Zellen aus der 1. Passage in vitro wurden abzentrifugiert und zweimal mit steriler Hankslösung gewaschen. Anschließend wurden sie in 10 ml frisch angesetztem und sterilfiltriertem Reagenz aufgenommen und 5 - 10 Minuten behandelt; die Kontrolle befand sich dabei in reiner Hankslösung. Danach wurden die Zellen von überschüssigem Reagenz durch zweimaliges Auswaschen in Hanks befreit, in steriles Kulturmedium überführt und über 10 - 24 Stunden beobachtet.

Je nach Art des Versuches wurden alle 1,5 - 2 Stunden 2 - 5 ml Proben entnommen. Die Zelldichte betrug bei Versuchsbeginn 5×10^5 Zellen pro ml.

b) Bestimmung von Stoffwechselparametern

Lactatproduktion,

Na^+/K^+ -Gehalt,

^{14}C -Thymidin- und ^{14}C -Uridin-Einbau,

^{14}C - α -Aminoisobuttersäure-Transport,

Sauerstoffverbrauch mit der Clark-Elektrode

wurden bestimmt wie von KRAUSE [8] angegeben.

Die gemessenen Stoffwechselgrößen wurden in % der Kontrolle, bezogen auf die gleiche Zellzahl ausgedrückt.

c) Überprüfung der Vitalität

Routinemäßig wurde die Zahl der toten Zellen bei jeder Probenahme mitbestimmt. Darüberhinaus wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Reagenzien vorbe-handelt; alle zwei Stunden erfolgte dreifache Probenahme zur Nigrosinfärbung.

2.8. Messung des Einflusses von SH-Reagenzien auf den intrazellulären SH-Spiegel

Zur Überprüfung der Frage, inwieweit die untersuchten Reagenzien die Zellmembran passieren, wurde als Kriterium der intrazelluläre Nicht-Protein-SH Gehalt (= säure-lösliches SH) herangezogen. Bei den bisher noch nicht näher untersuchten Alkylierungsmitteln wurde zusätzlich die Aktivität der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase geprüft.

2.8.1. Wirkung auf den Nicht-Protein-SH Gehalt

a) Bestimmung des normalen NPSH Gehaltes mit DTNB und CPDS

Reagenzien: DTNB/CPDS 2 mM in Phosphat-Puffer 0,15 M pH 7,5
Perchlorsäure 4 N
tri-Kaliumphosphat 2 M
Phosphatpuffer 0,15 M pH 7,5

Zellmaterial:

$1,5 \times 10^8$ gewaschene Zellen wurden in 2 ml Puffer aufge-nommen und durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0,2 ml PCA wurde abzentrifugiert; 1,5 ml des sauren Überstandes wurden mit K_3PO_4 auf pH 7,5 gebracht.

Testansatz: Puffer 1,00 ml
 Probe 0,05 ml
 DTNB/CPDS 0,10 ml

Nach 7 Minuten wurden die Extinktionen bei 412 und 344 nm gegen einen Leerwert mit 0,05 ml Wasser gemessen.

b) Enzymatische Bestimmung des Glutathion Spiegels mit Glyoxalase I

Die Bestimmung wurde wie unter 2.4.b. angegeben durchgeführt. Es wurde die gleiche Zellprobe wie unter a) verwendet, so daß die ermittelten Werte direkt vergleichbar waren.

c) Chemische Bestimmung des Glutathions mit Alloxan

Prinzip [19]:

GSH reagiert mit Alloxan bei pH 7,5 unter Bildung einer Verbindung unbekannter Struktur, die bei 305 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum hat.

Reagenzien: Phosphat-Puffer 0,15 M pH 7,5
 Glycin 0,1 M
 Alloxan (Merck p.a.) 1 mg/ml HCl saures Wasser;
 vor jeder Bestimmung muß es frisch gelöst werden

Zellmaterial:

Die Zellen wurden wie unter a) angegeben behandelt. Für jeden Testansatz waren 2×10^7 Zellen nötig.

	Testansatz:	Leerwert:
Puffer	2,1 ml	2,3 ml
Glycin	0,2 ml	0,2 ml
Probe	0,2 ml	-
Alloxan	0,5 ml	0,5 ml

Der Testansatz wurde gegen den Leerwert bei 305 nm im Beckmann Acta III (Doppelstrahlverfahren) genau 20 Minuten gemessen.

Die Eichkurve wurde für GSH-Konzentrationen von 15 - 150 nMol/0,2 ml Eichlösung erstellt. Sie war in diesem Bereich linear und ergab für pH 7,5 einen Extinktionskoeffizienten von $1,4 \times 10^4$ L/Mol $\cdot$ cm.

d) Bestimmung des Gesamt-SH Gehaltes der EAT-Zellen

Versetzt man das Reaktionsgemisch DTNB/Cystein in Hankslösung mit PCA (Endkonzentration 0,4 N), so fällt das nicht umgesetzte DTNB aus, während die 2-Nitro-5-Mercapto-benzoesäure in Lösung bleibt, wie durch Neutralisation mit K_3PO_4 auf pH 7,5 und Überprüfung der Extinktion bei 412 nm nachgewiesen wurde. Das gleiche gilt für CPDS.

Es ist demnach möglich, einen kompletten Zellaufschluß mit DTNB zu inkubieren und nach Enteiweißung und Neutralisation die Konzentration an frei zugänglichen SH-Gruppen zu bestimmen.

Reagenzien und Zellmaterial wie unter a) angegeben.

Testansatz:	Beschallte Zellen	0,1 ml
	Puffer	1,9 ml
	DTNB/CPDS	1,0 ml

Der Leerwert enthielt 0,1 ml Puffer

Man ließ 15 Minuten im Eisbad reagieren. Nach Zugabe von PCA, auch zum Leerwert, und anschließender Neutralisation wurden die Extinktionen bei 412 bzw. 344 nm bestimmt.

e) Auswirkung von SH-Blockern auf den NPSH Spiegel
intakter Zellen

Reagenzien: JAC, JAA 0,8 und 1,6 mM
BAAIP, BASS 0,8; 1,6; 8,0 mM
NEM 0,8 und 1,6 mM
NCPM 0,4; 0,8; 1,6 mM
pCMB (Fluka pur.) 0,08 mM
pCMBS (Sigma) 0,08 und 0,16 mM in Phosphat-
Puffer
DTNB 2 mM
alle Reagenzien in Hankslösung

Durchführung:

6×10^7 Zellen eines 7 Tage alten Ascites wurden in 10 ml
Reagenzlösung 5 Minuten, mit BAAJP bzw. BASS 10 Minuten,
bei 37°C inkubiert, dreimal ausgewaschen, in Phosphat-
Puffer aufgenommen und wie vorher aufgearbeitet. Der
Gehalt an säurelöslichem SH wurde mit DTNB bestimmt.

Da alle Ansätze innerhalb einer Meßreihe das gleiche Zell-
material und die gleiche Zelldichte enthielten, wurden die
ermittelten Extinktionen gleich 100 % gesetzt und der
NPSH Spiegel der behandelten Zellen in % der Kontrolle
ausgedrückt.

2.8.2. Wirkung auf die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

a) Bestimmung der GAPDH Aktivität in EAT-Zellen

Prinzip [20]:

Die Aktivität der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
wird über die Umsetzung von NADH und 1,3-di -Phosphogly-
cerat gemessen, das erst im Testansatz aus Glycerat-3-
Phosphat und Adenosintriphosphat (ATP) mit Hilfe der
Phosphoglycerat-Kinase (PGK) gebildet wird.

Reagenzien und Testansatz:

Triäthanolaminpuffer (0,1 M pH 7,6)	2,58 ml
Glycerat-3-P (0,08 M)	0,10 ml
ATP (1,6 mM)	0,20 ml
EDTA (0,5 mM)	0,10 ml
NADH (1,3 mM)	0,05 ml
PGK (Boehringer) (1 mg/ml)	0,05 ml
Probe mit GAPDH	0,02 ml

Es wurde die Abnahme der Extinktion bei 366 nm verfolgt.

Der TEA-Puffer für den Zellaufschluß bestand aus:

TEA 50 mM; EDTA 1 mM; $MgCl_2$ 2 mM; Mercaptoäthanol 30 mM

Zellmaterial:

$1,5 \times 10^7$ Zellen wurden in 2 ml TEA-Puffer beschallt.

b) Aktivität der GAPDH nach Behandlung der Zellen mit Alkylierungsmitteln

1. Kulturzellen in der 2. Passage

Die Zellen wurden wie unter 2.7.a. angegeben mit BAAIP und BASS vorbehandelt. Nach 2 bzw. 6 Stunden in der Kultur wurden 20 ml für den GAPDH-Test entnommen, ferner Proben zur Bestimmung der Lactatproduktion und der Vitalität.

2. Zellen direkt aus der Maus

Die Zellen wurden mit BAAIP (0,08; 0,8; 8; 16 mM) 10 Minuten und zum Vergleich mit 0,8 mM JAC 5 Minuten vorbehandelt und wie vorher aufgearbeitet.

Die Aktivität der Kontrollzellen wurde innerhalb einer Meßreihe 100 % gesetzt und die Aktivität der behandelten Zellen in % der Kontrolle ausgedrückt.

2.9. Untersuchungen über die freien SH-Funktionen der Zelloberfläche

Die von GRASSETTI [14] eingeführte Methode zur Bestimmung von SH-Gruppen auf der nativen Zelloberfläche (vgl. Abschnitt 2.2.a.) kann vereinfacht werden, indem man das bei direkter Reaktion von SH-Gruppen mit einem Disulfid (CPDS oder DTNB) entstehende Produkt als Maß für die Zahl aller freien SH-Funktionen betrachtet.

a) SH-Gehalt der Zelloberfläche von Kulturzellen und Mäuse-Ascites-Zellen

Es wurde geprüft, ob ein Unterschied in der Zahl der freien SH-Gruppen an der Oberfläche von Kulturzellen der 1. Passage in vitro und von Zellen, die direkt einer Maus entnommen wurden, besteht.

Durchführung:

Zellen einer Maus mit 6 Tage altem Ascites wurden in Kultur genommen. Am nächsten Tag wurden diese Kulturzellen neben frisch abpunktierten Zellen einer Maus mit 7 Tage altem Ascites aus der gleichen Serie mit Hankslösung gut gewaschen. Pro Ansatz wurden 5×10^7 Zellen in 5 ml DTNB Lösung (1 mM) 10 Minuten inkubiert.

Die Proben wurden anschließend schnell in der kalten Zentrifuge vom Zellmaterial befreit und gegen einen Leerwert, der die gleiche Menge DTNB enthielt, bei 412 nm gemessen.

b) Wirkung von SH-Reagenzien auf die Zahl der freien SH-Gruppen an Zelloberflächen

Bestimmung über Disulfidaustauschreaktion

Reagenzien: CPDS 1 mM
JAC, JAA, BASS, BAAIP, NEM, NCPM, 0,8 mM;
pCMB, pCMBS 0,08 mM;
alle in Hankslösung, pCMB in wenig Phosphat-
Puffer vorgelöst und mit Hankslösung verdünnt

Durchführung:

1×10^8 Zellen wurden in 8 ml Reagenzlösung - die Kontrolle in 8 ml Hankslösung - 5 Minuten inkubiert. Nach Beendigung wurde mit 30 ml Hankslösung verdünnt, abzentrifugiert und noch dreimal gut gewaschen, vollständig abgossen, die Gläser ausgetrocknet.

Die Zellen wurden in 10 ml CPDS-Lösung aufgenommen und darin 10 Minuten inkubiert. Nach Probenahme zur Bestimmung der Totzahl wurden die Zellen kalt abzentrifugiert, die Überstände wie unter a) angegeben gemessen. Die Extinktion der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt, die Extinktionen der Proben in % der Kontrolle ausgedrückt.

c) Versuche zum elektronenmikroskopischen Nachweis von Oberflächen-SH-Gruppen mit Quecksilberphenyl-Azoferritin

Zur Markierung von Proteinen werden in der Elektronenmikroskopie Ferritinderivate verwendet [21]. Zum Nachweis freier SH-Gruppen in Proteinen wird das Quecksilberphenyl-Azoferritin eingesetzt [22]. Quecksilberphenyl-Azoferritin erhält man durch kovalente Verknüpfung von N-Acetoxymercurianilin mit Ferritin. Dieses Konjugat kann über das Quecksilber mit SH-Gruppen in Gewebe oder an Zellen reagieren. Ferritin hat ein MG von ca. 460 000 und enthält 23 Eisen [21]. Wegen seiner hohen Elektronendichte können einzelne Moleküle im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden, und somit auch die Stellen lokalisiert werden, an denen es zur Ausbildung von Mercaptidbindungen kommt.

Prinzip:

p-Acetoxy-mercurianilin wird mit NaNO_2 diazotiert. Das Diazoniumsalz wird nach PHILLIPS [23] zur Verbesserung der Stabilität auf einen Kationenaustauscher gebracht und anschließend in Gegenwart von NaOH langsam mit den Tyrosin - Histidin- und Lysin-Gruppen des Ferritins zu Azoferritin gekuppelt.

Durchführung:

Es wurde weitgehend nach der Methode von HASSELBACH [22] gearbeitet.

1. Blockierung der SH-Gruppen im Ferritin

4 mg NEM wurden in 7 ml Natriumphosphat-Puffer 1 mM, pH 7,5 gelöst und dazu 40 mg Ferritin (Serva 5 x krist. 0,1 % Cd haltig) eingerührt und 3 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt.

2. Darstellung von p-Diazomercuriphenol

175 mg Acetoxymmercurianilin (EGA-Chemie) wurden in 20 ml Eisessig/Wasser (3 : 2) gelöst. Man ließ 50 mg in 0,5 ml H_2O gelöstes NaNO_2 bei guter Kühlung unter ständigem Rühren langsam zutropfen und verfolgte die Bildung des Diazoniumsalzes mit alkalischer Naphtollösung. Dann wurde 1 ml Dowex 50W-X2 (Serva p.a.) zugegeben, und nachdem durch Tüpfeln mit alkalischer α -Naphtollösung das Ende des Austausches festgestellt wurde, wurde das Harz auf einer Glasfritte abgesaugt und zehnmal mit eiskaltem Wasser nachgewaschen.

3. Kupplung

Zur Kupplung wurde wie folgt verfahren:

Zur vorgelegten eisgekühlten Ferritinlösung wurde das Harz über eine Stunde lang eingerührt. Dabei wurde der pH-Wert durch Zugabe von 0,5 N NaOH mit einer Mikrobürette automatisch auf 6,0 gehalten, danach innerhalb einer weiteren

Stunde auf 7,5 erhöht. Anschließend wurde unter ständiger pH-Kontrolle noch eine weitere Stunde gerührt. Das vom Harz über Glaswolle abgetrennte Ferritin wurde 36 Stunden gegen 1 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

4. Behandlung von Zellen mit Azoferritin nach vorheriger Inkubation mit NEM

Das lyophilisierte Azoferritin (30 mg) wurde in 17 ml Hankspuffer gelöst und zusammen mit 8 ml einer mit NEM vorbehandelten Ferritinlösung (15 mg) 10 Minuten bei 13 000 g abzentrifugiert. Die geringe Menge an rötlichem Niederschlag im Azoferritin und der gelb-orange Niederschlag des Ferritins wurden verworfen.

Aus 200 ml Zellkultur (1. Passage) wurden 3 Inkubationsansätze hergestellt:

- | | | |
|----|--|--------------------------|
| A) | 2 ml Zellsuspension à 5×10^7 Zellen | + 8 ml Hanks |
| B) | 2 ml Zellsuspension " " " " | + 8 ml Hanks |
| C) | 2 ml Zellsuspension " " " " | + 8 ml NEM
(0,1 mM) |

Nach 5 Minuten Inkubation wurde mit 20 ml Hanks verdünnt, abzentrifugiert, einmal mit 40 ml Hanks gewaschen und in 2 ml Hanks aufgenommen. Nun wurde hinzugefügt:

- | | |
|----|-----------------------|
| A) | + 8 ml Ferritin |
| B) | + 8 ml Hg-Azoferritin |
| C) | + 8 ml Hg-Azoferritin |

und 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit 20 ml Hanks verdünnt, bei 500 g abzentrifugiert, einmal mit Hanks und zweimal mit 30 ml Phosphat-Puffer nachgewaschen. Beim letzten Mal wurde bei 7000 g im Ausschwingrotor 10 Minuten zentrifugiert. Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen *) wurden die Zellen mit Glutaraldehyd/ OsO_4 fixiert.

*) Wir danken Frau Dr. R. Marx und Mitarbeitern (Physiologisch-Chemisches Institut I, Marburg) für die freundliche Ausföhrung von Fixierung, Schnitten und Aufnahmen.

2.9.1. Bestimmung membrangebundener Enzymaktivitäten

a) Bestimmung der ATP-ase Aktivität und Wirkung von potentiellen Inhibitoren

Die Bestimmung verlief weitgehend wie in [8] angegeben ist. Gemessen wurde das aus ATP in Gegenwart von intakten Zellen freigesetzte anorganische Phosphat nach der Methode von EIBL und LANDS [24].

Reagenzien: Tris-Puffer 0,15 M pH 7,5
ATP 10 mM in Inkubationslösung
Inkubationslösung nach BONTING [25]:
1 mM $MgCl_2$; 5 mM KCl; 10 mM NaCN; 93 mM Tris;
46 mM NaCl; mit konz. HCl auf pH 7,5 eingestellt
Inhibitoren
JAC, BASS, BAAIP, NEM, NCPM, pCMB, pCMBS,
DTNB, CPDS, Ouabain, alle 1 mM in Tris-Puffer

Die ATP-ase Aktivität von intakten und beschallten Kulturzellen wurde in diesem Inkubationsmedium bestimmt. Da der Anteil toter Zellen nach Beendigung der Inkubation sehr hoch war, und bei einigen Versuchen das anwesende Cyanid gestört hätte, wurde in den Serien mit den Inhibitoren das CN^- weggelassen und durch NaCl ersetzt.

Durchführung:

2 ml Zellkultur (1×10^6 Zellen) wurden abzentrifugiert (3 min 500 g). Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml Tris-Puffer gewaschen und anschließend in 4,5 ml Inkubationsmedium aufgenommen, in Gegenwart von Hemmstoffen in 4 ml Inkubationsmedium und 0,5 ml Reagenzlösung.

Die Zellen wurden 5 Minuten bei $37^\circ C$ vorgewärmt, danach mit 0,5 ml ATP-Lösung versetzt. Nach 30, 40, 50 und 60 Minuten wurde je eine Probe von 0,5 ml entnommen und mit 50 μl TCA enteiweißt. Die Proben blieben 5 Minuten im Eisbad und wurden dann sofort eingefroren. Vor der Phosphatbestimmung taute man sie rasch auf, zentrifugierte

30 Sekunden in der Eppendorf Tischzentrifuge und gab sie unmittelbar danach in den Testansatz.

Phosphatbestimmung

Reagenzien: Phosphat-Standard 10 - 150 nMol Phosphat in 4,5 ml
Triton X 100 (Serva, pract.) 1 %
Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/100 ml
6 N H_2SO_4

Testansatz: H_2O 4,00 ml
Probe 0,50 ml (Leerwert 0,5 ml H_2O)
Triton 0,05 ml
Molybdat 0,50 ml

Die Ansätze wurden gemischt. Die auftretende Trübung wurde nach genau 20 Minuten als Extinktion bei 660 nm gemessen.

b) Bestimmung der Phosphatase-Aktivität und Effekte potentieller Inhibitoren

Das aus p-Nitrophenylphosphat in Gegenwart von Zellen freigesetzte p-Nitrophenol wurde photometrisch bestimmt [26]

Reagenzien: Zur Ermittlung des geeigneten Inkubationsmediums:
Inkubationslösung 0. CN^- wie bei ATPase pH 7,4
Ringerlösung pH 6,8
Tris-Puffer pH 7,4
Krebs-Ringer-Bicarbonat 0. Phosphat pH 7,3
Cholinchlorid/HCl pH 7,4
Glycin/Imidazol/HCl pH 7,4
alle isotonisch
Zur Aktivitätsbestimmung:
Inkubationsmedium 0. CN^- pH 6,5/7,0/7,5/8,0
p-Nitrophenylphosphat (Merck p.a.) 10 mM
5 N NaOH

Inhibitoren:

Es wurden die gleichen Inhibitoren wie bei der ATP-ase Messung verwendet; zusätzlich JAA; ihre Konzentration war 1 mM in Tris-Puffer

Durchführung:

Wie bei ATP-ase, jedoch 5×10^6 Zellen/Ansatz. Gestartet wurde durch Zugabe von 0,5 ml pNPP-Lösung. Der Leerwert enthielt 4,5 ml Inkubationslösung (bzw. 4,0 ml + 0,5 ml Inhibitorlösung) + 0,5 ml pNPP. Nach 30 Minuten Inkubation wurde 1 Minute in der eiskalten Zentrifuge abzentrifugiert. Bei einigen Ansätzen wurden nach 5, 15, 30 Minuten Proben entnommen.

Test:

1 ml Überstand wurde sofort nach Ende der Zentrifugation mit 50 μ l 5 N NaOH versetzt. Der dabei auftretende feinkristalline Niederschlag wurde durch Zentrifugation entfernt, der Überstand gegen einen gleich behandelten Leerwert bei 405 nm gemessen.

Zur Berechnung der Konzentration des entstandenen pNP wurde eine Eichkurve aufgenommen und ein Extinktionskoeffizient von $2,1 \times 10^4$ L/Mol $\cdot$ cm ermittelt.

2.9.2. Wirkung von Dithioerythrit und Neuraminidase auf die Zahl der Oberflächen-SH-Gruppen

Es wurde untersucht, ob durch Reduktion von Disulfidbrücken auf der Zelloberfläche mit Dithioerythrit und durch Entfernung der Sialinsäurereste mit Neuraminidase eine Erhöhung der Anzahl der mit DTNB nachweisbaren SH-Gruppen eintritt.

a) Behandlung von EAT-Zellen mit DTE

Durchführung:

$1,5 \times 10^8$ Zellen/Ansatz wurden 20 Minuten in 10 ml einer 1,5 mM 1,4-Dithioerythrit-Lösung (Merck, für biochem. Zwecke) inkubiert, die Kontrollzellen in Hanks. Nach Verdünnen mit Hanks wurde abzentrifugiert und zur voll-

ständigen Entfernung des DTE dreimal mit 30 ml Hanks gewaschen.

Proben und Kontrolle wurden danach in 10 ml CPDS bzw. DTNB (1 mM) aufgenommen und 10 Minuten inkubiert. Die Überstände wurden gegen reine Reagenzlösung gemessen.

b) Behandlung von EAT-Zellen mit Neuraminidase

1. Methode zur quantitativen Sialinsäurebestimmung

Die Sialinsäure wurde durch Neuraminidase von Zellen abgespalten und anschließend mit dem Test nach WARREN [27] bestimmt.

Prinzip:

N-Acetyl-Neuraminsäure wird in stark saurer Lösung durch Perjodat gespalten. Die entstandene β -Formylbrenztraubensäure wird mit 2-Thiobarbitursäure gekuppelt, das Reaktionsprodukt mit einem organischen Lösungsmittel ausgeschüttelt und bei 550 nm gemessen.

Reagenzien: Neuraminidase aus vibrio cholerae (Behringwerke)
500 units/ml [28]
Natrium-meta-Perjodat 0,2 M in 9 M Phosphorsäure
Natrium-Arsenit 10 % in 0,5 M Na_2SO_4 /
0,1 N H_2SO_4
Thiobarbitursäure 0,6 % in 0,5 M Na_2SO_4
n-Butanol mit 5 % 12 N HCl [29]
N-Acetylneuraminsäure (Boehringer) für die
Eichkurve 10 - 60 nMol/0,2 ml Eichlösung

Testansatz: 0,2 ml Probelösung und 0,1 ml Perjodatlösung wurden zusammen 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,0 ml Arsenitlösung wurde so lange geschüttelt, bis die gelb-braune Farbe verschwand. Nach Zugabe von 3,0 ml Thiobarbitursäure wurden die verschlossenen Gläser 15 Minuten ins kochende Wasserbad gestellt. Nach 5 Minuten Abkühlen in Eiswasser wurden 3 ml aus den Probegläschen entnommen und mit 3 ml Butanol kräftig geschüttelt, zur Phasentrennung zentrifugiert.

Die Extinktion der Butanolphase wurde bei 550 nm gegen einen Leerwert mit 0,2 ml Wasser statt Probelösung gemessen. Der aus der Eichkurve abgelesene Extinktionskoeffizient lag bei $4,17 \times 10^4$ L/Mol·cm.

2. Quantitative Bestimmung der durch Neuraminidase abspaltbaren Sialinsäure

Durchführung:

Frisch abpunktierte Ascites wurde nach Auswaschen in Medium noch dreimal mit je 120 ml Hankslösung behandelt, 2×10^8 Zellen/Ansatz wurden in 3 ml Hanks mit 50 units Neuraminidase insgesamt 60 Minuten inkubiert. Nach 0, 7,5, 15, 30, 60 Minuten wurden Proben genommen, 30 Sekunden in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Trichloressigsäure enteiweißt. 0,2 ml des klaren Überstandes wurden anschließend zum Test verwendet. Zwischen 30 und 60 Minuten wurde eine Probe zur Bestimmung der Zahl der toten Zellen entnommen.

3. Bestimmung der SH-Gruppen nach Behandlung der Zellen mit Neuraminidase

Durchführung:

a) die Versuche wurden sowohl mit Kulturzellen als auch mit frisch abpunktiertem Ascites durchgeführt. 5×10^7 Zellen wurden in Hankslösung mit 20 units Neuraminidase 30 Minuten inkubiert, einmal gewaschen und in 5 ml DTNB wieder aufgenommen. Nach 10 Minuten Inkubation wurde die Extinktion des Überstandes gegen reines DTNB gemessen.

b) Bestimmung der pNPP-ase Aktivität nach Behandlung mit Neuraminidase

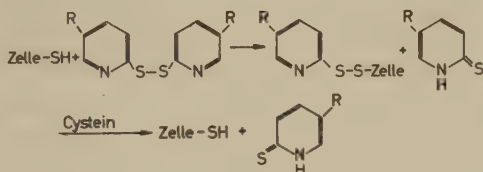
1×10^7 Zellen wurden wie vorher mit Neuraminidase inkubiert, nach dem Auswaschen in Inkubationslösung (siehe 2.9.1.b.) aufgenommen und zusammen mit pNPP inkubiert. Die pNPP Aktivität der Zellen ohne Vorbehandlung wurde gleich 100 % gesetzt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN

3.1. Zahl der SH-Gruppen auf der Oberfläche von EAT-Zellen

a) mit Carboxypyridindisulfid

Diese Bestimmung wurde analog zu GRASSETTIs Angaben [14, 30] durchgeführt:



Nach Reaktion der Zellen mit CPDS (Primärreaktion), wurde überschüssiges CPDS und Carboxypyridinthion (CPT) durch mehrmaliges Waschen entfernt und das an der Zelloberfläche gebundene CPT mit Cystein abgespalten (Sekundärreaktion). Aus der Extinktion bei 344 nm des durch 30 Minuten Cystein-einwirkung abgespaltenen CPT wurde die Konzentration an SH auf der Zelloberfläche berechnet (siehe auch Abb. 3):

0,55 nMol SH / 10^6 Zellen bzw.

$3,3 \times 10^8$ SH-Gruppen pro Zelle

Die Standardabweichung [31] des aus 40 Bestimmungen gemittelten Wertes betrug ± 22 %.

Eine Vorstellung von der Dichte der SH-Gruppen auf der Zelloberfläche vermittelt der Wert von

4,1 SH-Gruppen / $1000 \text{ \AA}^2$

Für diese Berechnung wurde ein Durchmesser von 16μ [6] und eine Oberfläche von $800 \mu\text{m}^2$ der EAT-Zelle zugrundegelegt.

b) mit Mercurochrom

Die Spaltung der Mercaptidbindung zwischen Zelloberfläche und Reagenz wurde ebenfalls mit Cystein durchgeführt (Abb. 1). Aus der Extinktion bei 510 nm des abgespaltenen Produktes ergab sich eine SH-Konzentration von:

$$0,12 \text{ nMol SH} / 10^6 \text{ Zellen}$$

Die Standardabweichung des aus 10 Bestimmungen gemittelten Wertes betrug $\pm 15 \%$.

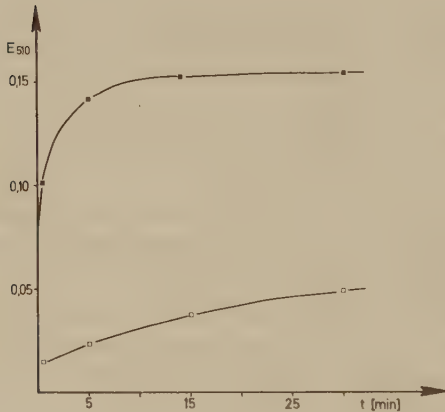


Abb. 1 :

Abspaltung des
Mercurochroms
(E 510 nm) von der
Zelloberfläche in
Abhängigkeit von der
Zeit

- mit Cys
- ohne Cys

3.2. Kritik der Grassetti-Methode zur Bestimmung der SH-Gruppen an Zelloberflächen.

3.2.1. Einfluß der Reaktionsbedingungen und der Art des Reagenzes auf die quantitative Bestimmung

a) Vergleich zwischen CPDS und DTNB

GRASSETTI und MERISHI [30, 33, 34] berichten, daß DTNB zum quantitativen Nachweis von SH-Gruppen auf der Zelloberfläche weitaus weniger geeignet sei als CPDS. Zur Über-

prüfung dieser Feststellung wurden in einer gesonderten Versuchsserie Zellen der gleichen Charge nebeneinander mit CPDS und DTNB unter völlig gleichen Bedingungen behandelt, so daß man die Meßwerte direkt miteinander vergleichen kann (Tab. 1).

Tab. 1: Quantitative Bestimmung der SH-Gruppen auf der EAT-Zelloberfläche mit CPDS und DTNB, Mittelwerte aus 20 Bestimmungen, $\pm$ Standardabweichung

Reagenz	Inkub.Überstand nMol SH / 10^6 Z	Cys-Inkub. Überstand nMol SH / 10^6 Z
CPDS	1,25 $\pm$ 0,07	0,107 $\pm$ 0,030
DTNB	1,10 $\pm$ 0,10	0,102 $\pm$ 0,035

Es konnte nicht geklärt werden, warum innerhalb dieser Versuchsserie die Werte für die Sekundärreaktion mit Cystein verglichen mit den Ergebnissen in 3.1.a.so niedrig lagen.

b) Einfluß der Temperatur

In dieser Meßreihe wurden die Zellen während des gesamten Versuchs bei erniedrigten Temperaturen gehalten, also bereits während der Waschvorgänge, die der Inkubation mit dem Disulfid vorausgingen, bis zur Abspaltung des Thions durch Cystein.

In Abbildung 2 sind die für 2×10^8 Zellen / 7 ml ermittelten Extinktionen bei 344 nm gegen die Versuchstemperatur aufgetragen. In Tabelle 2 sind die daraus errechneten Konzentrationen an SH angegeben. Danach reagieren bei 12°C Versuchstemperatur 85 % der bei 37°C frei zugänglichen SH-Gruppen, jedoch lassen sich nach der Cystein-Inkubation bei 12°C nur 20 % SH-Gruppen der Zelloberfläche nachweisen.

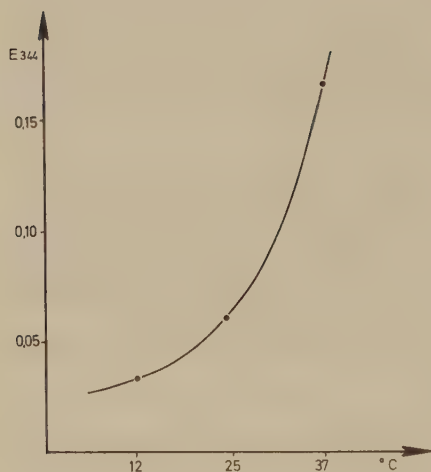


Abb. 2:

Extinktionen der Cystein-Inkubationsüberstände nach Behandlung von Zellen mit CPDS bei drei verschiedenen Temperaturen, Mittelwert aus 10 Bestimmungen für 2×10^8 Zellen/7 ml

Tab. 2: Aus Abb. 2 errechnete SH-Konzentration für 10^6 Zellen (+ Standardabweichung) neben Angaben über die SH-Konzentration des CPDS-Inkubationsüberstandes

Temperatur °C	Inkub. Überstand nMol SH / 10^6 Z	Cys-Inkub. Überstand nMol SH / 10^6 Z
12	1,3	0,10 ± 0,03
25	1,4	0,19 ± 0,04
37	1,5	0,50 ± 0,12

c) Abspaltung des CPT mit und ohne Cystein, in Hanks-
lösung und in Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer

In zwei parallelen Serien wurden die Zellen wie vorher nach Auswaschen des überschüssigen CPDS mit Cystein inkubiert, der andere Teil wurde mit reiner Hankslösung inkubiert.

Aus Abbildung 3 sind zwei Befunde zu entnehmen:

1. ist die Abspaltung des Thions nach 5 Minuten noch nicht beendet, wie von GRASSETTI [14] beschrieben,
2. tritt die Abspaltung des CPT-Restes auch ohne exogen zugegebenes Cystein ein.

Die Spektren der beiden Überstände zwischen 400 und 250 nm stellen sicher, daß in beiden Fällen die gleiche Verbindung abgespalten wird.

Eine weitere Versuchsserie, in der die Zellen parallel in Hankslösung und in Krebs-Ringer-Bicarbonat behandelt wurden, lieferte im Hinblick auf die spontane Abspaltung das gleiche Ergebnis, erbrachte aber für die quantitative SH-Gruppenbestimmung niedrigere Werte (Abb. 3).

d) Analyse der Waschwässer

Wenn, wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist, das CPT ohne zugegebene Mercaptane von der Zelloberfläche abgespalten wird, dann ist zu erwarten, daß dieser Prozeß bereits zu irgendeinem früheren Zeitpunkt eingesetzt haben muß. Die Analyse der Waschwässer sollte klären, zu welchem Zeitpunkt das CPDS vollständig entfernt ist und ob sich das CPT allein nachweisen läßt.

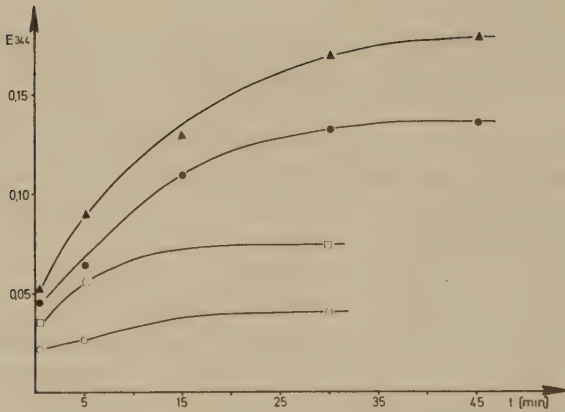


Abb. 3: Abspaltung des CPT (E 344 nm) von der Zelloberfläche, unter verschiedenen Bedingungen, in Abhängigkeit von der Zeit, gemittelt aus 12 Bestimmungen, Standardabweichung 20 - 25 %

● Hanks

▲ + Cys/Hanks

○ KRB

□ + Cys/KRB

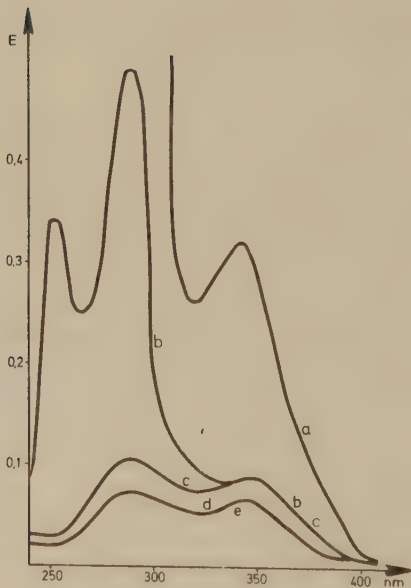


Abb. 4:

Spektren der zellfreien Überstände nach der Inkubation mit CPDS und nach dem Auswaschen

a CPDS-Inkubation

b 1. Waschung

c 2. Waschung

d 3. Waschung

e 4. Waschung

Abbildung 4 zeigt die Absorptionsspektren (gegen Hanks) der einzelnen Proben. Es ist deutlich zu sehen, daß erstens das CPDS (λ_{max} 290 und 250 nm) nach der 2. Waschung der Zellen aus dem Überstand entfernt ist, daß zweitens das charakteristische CPT-Spektrum nicht verschwindet. Das erklärt auch, warum bei der spontanen Thionspaltung ohne Cystein beim Nullwert (Abb. 3) immer eine erhebliche Absorption des Überstandes bei 344 nm festzustellen ist.

Wie GRASSETTI berichtet [14] und wie auch in eigenen Untersuchungen nachgewiesen wurde, ist das CPDS wärmeempfindlich. Bei Erhitzen einer Lösung auf 100°C kommt es zu einer fast vollständigen Spaltung der Verbindung und zu einem rapiden Anstieg der E 344 nm. Nach Erhitzen der Waschwässer und Vergleich ihrer Extinktionen vor und nach der Behandlung, konnte festgestellt werden, daß bereits ab der 2. Lösung durch Erwärmung kein wesentlicher Anstieg der E 344 nm zu beobachten war. Auch dieser Befund ist so zu deuten, daß es sich bei dem - wenn auch in geringer Konzentration - vorhandenen CPT gar nicht um das Produkt handelt, das beim ersten Disulfidaustausch mit der Zelloberfläche entstanden ist (dieses sollte bis zum 2. Waschen ebenfalls verschwunden sein) sondern um den Teil des CPDS, der mit der Zelle das gemischte Disulfid gebildet hat und der nun ständig während des Auswaschens spontan von der Zelle abgespalten wird. .

e) Inkubation von Zellen mit CPDS und DTNB über längere Zeit, Analyse der Primärreaktion

Die Zellen wurden mit den beiden Disulfiden bis zu 30 Minuten behandelt. Die Extinktionen der vom Zellmaterial befreiten Überstände nach verschiedenen Inkubationszeiten sind in Abbildung 5 wiedergegeben. Bei 8 von insgesamt

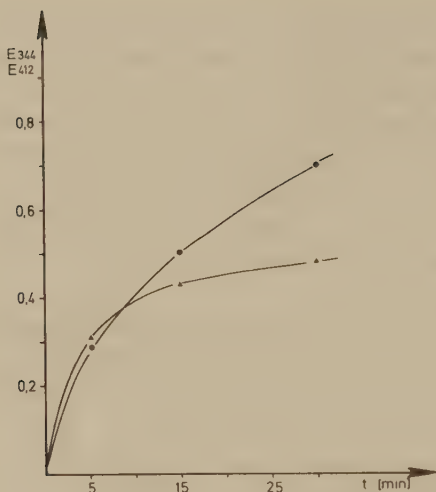


Abb. 5 :

Inkubation von 2×10^8
Zellen/10 ml mit
0,75 mM DTNB (E 412 ▲)
und mit 0,75 mM CPDS
(E 344 ●) über 30 min.

12 durchgeführten Versuchen zeigten die E 412 und 344 nm den abgebildeten charakteristischen Verlauf. In einem Versuch wurde auch für die E 412 der gleiche rapide Anstieg gemessen wie für die E 344 und bei zwei Versuchen nahm die Extinktion bei beiden Reagenzien nach 15 Minuten kaum noch zu. Obwohl ein leichter Anstieg des Proteingehaltes der Überstände zu beobachten war, stieg die Zahl der toten Zellen im Laufe der Inkubation nicht signifikant an. Aus dem unterschiedlichen Verhalten der Reagenzien während dieser Experimente kann man folgern, daß sich diese Verbindungen nicht gleichartig auf die Zellen auswirken. So deutet der rapide Anstieg der E 344 daraufhin, daß es zu Folgereaktionen auf oder in der Membran kommt, oder daß das Disulfid durch die Membran in die Zelle eingedrungen ist und die Spaltprodukte die Zelle wieder verlassen haben.

3.2.2. Glutathionreduktase Aktivität von EAT-Zellen

Diese Untersuchungen hatten das Ziel, zu klären, inwiefern die hohe Extinktion der Primärreaktion durch eine zusätzliche enzymatische Reduktion des verwendeten Disulfids zustandekommen kann. Auch GRASSETTI nimmt als Ursache für diesen Effekt enzymatische Aktivitäten an, um welche Enzyme es sich dabei handeln könnte, wird nicht erläutert [14].

a) DTNB und CPDS als Substrate der Glutathionreduktase

Es wurde zunächst festgestellt, in welchem Umfang Glutathionreduktase die beiden Disulfide umsetzt. Die Reaktion mit CPDS wurde quantitativ nicht ausgewertet, da dem Absinken der Extinktion bei 340/366 nm des dabei verbrauchten NADPH eine Zunahme der E 344 gegenübersteht. Aus dem leichten Extinktionsanstieg bei dieser Wellenlänge wurde geschlossen, daß CPDS als Substrat umgesetzt wird. Der Umsatz des DTNB ließ sich aber über das Anwachsen der Extinktion bei 412 nm eindeutig bestimmen. Für Glutathionreduktase aus Hefe wurde die Michaeliskonstante für DTNB ermittelt:

$$K_m = 7,5 \times 10^{-4} \text{ Mol/L}$$

Für GSSG gibt BERGMAYER [17] an:

$$K_m = 6,1 \times 10^{-5} \text{ Mol/L}$$

b) Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glutathionreduktase im Zellhomogenat

Die Bestimmungen der spezifischen Aktivität des Enzyms im Zellhomogenat ergaben:

1. Kulturzellen $2,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{Mol GSSG/ min} \cdot \text{mg Protein}$
2. Maus-Ascites $2,4 \times 10^{-2}$ $\mu\text{Mol GSSG/ min} \cdot \text{mg Protein}$
3. Maus-Ascites $2,6 \times 10^{-3}$ $\mu\text{Mol DTNB/ min} \cdot \text{mg Protein}$

c) Inkubation von Zellen mit DTNB, GSSG, NADH, NADPH und Analyse der Primärreaktion

Die Experimente zur Inkubation von intakten Zellen mit GSSG und reduzierten Pyridinnukleotiden zusammen mit DTNB sollten Aufschluß über eine mögliche Beteiligung der Glutathionreduktase bei der Reaktion mit DTNB geben. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich ist, erhöht die Zugabe von NADH oder von GSSG nicht die Extinktion bei 412 nm.

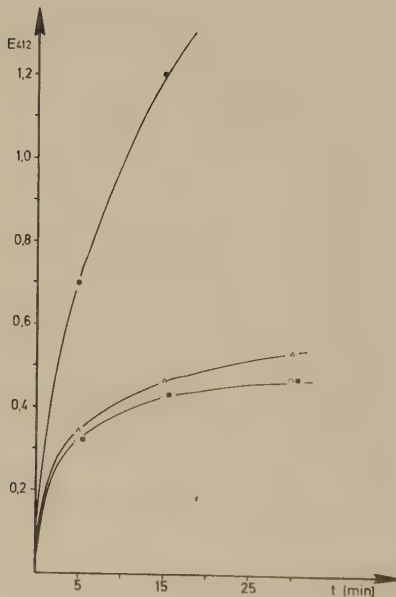


Abb. 6 :

Inkubation von 2×10^8 Zellen/10 ml mit 0,75 mM DTNB in Gegenwart von 0,5 mM NADH, NADPH, GSSG

- DTNB
- + NADH/GSSG
- △ + NADPH
- + NADPH + GSSG

Wird neben DTNB auch NADPH angeboten, so steigt die E 412 um 5 - 10 % an. Bei Inkubation mit DTNB + GSSG + NADPH war ein rapider Anstieg zu beobachten.

Dieser steile Anstieg der Extinktion kann nur durch anwesende Glutathionreduktase zustandekommen, die das zugesetzte GSSG mit Hilfe des ebenfalls zugegebenen NADPH spaltet.

Zur Beantwortung der Frage, ob eine in der Zelloberfläche lokalisierte GSSG-Reduktase Aktivität nachweisbar ist, wurden intakte Zellen, bzw. Zellüberstände nach einer Inkubation mit reiner Pufferlösung, mit GSSG und NADPH versetzt. DTNB diente nach Beendigung der Inkubation als Nachweis für freies SH. Es zeigte sich, daß die Konzentration der entstandenen 2-Nitro-5-mercaptobenzoessäure unabhängig davon, ob GSSG und NADPH direkt zum Inkubationsansatz oder erst zum zellfreien Überstand zugegeben worden waren, die gleiche war.

Aus diesen Befunden ließen sich folgende Rückschlüsse ziehen:

Die in den Versuchsansätzen nachweisbare Glutathionreduktase gelangt ausschließlich durch lysiertes Zellmaterial in den Überstand und haftet nicht der Plasmamembran an. Unter normalen Inkubationsbedingungen kann der Beitrag der Glutathionreduktase zur Reduktion des DTNB aber nicht ins Gewicht fallen, wenn man die geringe Zunahme des Umsatzes nach Zugabe großer Mengen NADPH ansieht. Außerdem demonstrieren die Versuchsansätze mit zusätzlichem GSSG (ohne NADPH) den Mangel an zur Umsetzung notwendigem NADPH. Die hohen Extinktionen der Primärreaktion von Zellen mit Disulfiden im Vergleich zur Sekundärreaktion nach Zugabe von Cystein läßt sich nicht mit einer zusätzlichen NADH- oder NADPH-abhängigen Reduktion erklären.

- d) Beteiligung der Glutathionreduktase an der spontanen Reduktion des gemischten Disulfids auf der Zelloberfläche

Zum Nachweis einer Beteiligung von exogener GSSG-Reduktase an der Sekundärreaktion waren die Zellen statt mit Cystein mit Glutathionreduktase aus Hefe und NADPH inkubiert worden. Die E 344 dieser Inkubationsüberstände wurde mit der von Kontrollzellen, die nach Entfernung des CPDS nur mit Hanks inkubiert wurden, verglichen. Die Extinktion der mit GSSG-Reduktase + NADPH inkubierten Ansätze war um durchschnittlich 30 % höher als die Kontrollen. Dieser Wert ist aber mit Unsicherheit behaftet ($\pm 18\%$), da es sehr schwierig war, im Bereich der geringen Extinktionen signifikante Veränderungen festzustellen.

3.2.3. Diskussion

Zahl der SH-Gruppen auf der EAT-Zelloberfläche

Die Arbeitsgruppe um GRASSETTI hat drei Berichte veröffentlicht, in denen Angaben zur Anzahl der SH-Gruppen auf einer einzelnen Zelloberfläche gemacht werden. So geben GRASSETTI und MURRAY [14] für einen Konzentrationsbereich des CPDS von 0,2 - 1,0 mM diese Zahl mit $3 - 10 \times 10^7$ SH-Gruppen/Zelle an, mit einem Standardfehler von 19 - 22 %. MERISHI und GRASSETTI erhielten für 0,2 mM CPDS bei einem anderen Ascitesstamm $2,7 \times 10^7$ SH-Gruppen/Zelle [30], MERISHI bei späteren Untersuchungen [33] $3,7 \times 10^7$ SH-Gruppen/Zelle. Die eigenen Ergebnisse - für eine Konzentration von 0,7 mM CPDS während der Inkubation - mit $3,5 \times 10^8$ SH-Gruppen/Zelle, berechnet aus 0,55 nMol SH/ 10^6 Zellen, liegen höher als diese Literaturangaben.

Die Differenz zu den Ergebnissen von GRASSETTI, die große Streuung der Meßwerte und der beobachtete Unterschied zwischen Primär- und Sekundärreaktion (Tab. 1 und 2) waren der Anlaß für weitere Überlegungen und Experimente zu dieser Methode.

Versuchsbedingungen

Zunächst muß beachtet werden, daß sich die Versuchsbedingungen von GRASSETTI von denen der eigenen Untersuchungen in zwei Punkten unterscheiden:

1. wurden die Zellen in 37°C warmer Hanks während des Versuches gehalten, die lediglich während der Zentrifugation etwas abkühlte. GRASSETTI arbeitete in 25°C Krebs-Ringer-Phosphat Pufferlösung, die etwa die gleiche Salzzusammensetzung wie Hanks hat, aber keine Glucose enthält.
2. Die Abspaltung des Carboxypyridinthions wurde mit Cystein über 30 Minuten durchgeführt, wohingegen GRASSETTI die Zellen nur 5 Minuten lang mit Glutathion behandelt hat.

Aufgrund des Befundes, daß die Reaktion mit Cystein nach 5 Minuten bei 37°C noch nicht beendet war und der Annahme, daß die Reduktion mit Glutathion bei 25°C nicht schneller abläuft, wird es für möglich gehalten, daß die Abspaltung nach 5 Minuten Inkubation auch bei GRASSETTI noch nicht zuende war und seine Werte höher gelegen hätten, wenn über längere Zeit mit dem Mercaptan inkubiert worden wäre. Betrachtet man die eigenen Ergebnisse der Versuche mit Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer ($1,8 \times 10^8$ SH-Gruppen/Zelle), so wird klar, daß das Ausmaß der Reaktion auf der Zelloberfläche offensichtlich von bestimmten in der Inkubationslösung enthaltenen Komponenten abhängt.

Berücksichtigt man, wie lange die Zellen während eines Experiments in Puffer gehalten wurden - vom ersten

Auswaschen bis zur Inkubation mit Cystein - so wird deutlich, daß sich der Zellstoffwechsel in Gegenwart von Glucose erheblich von dem in einem glucosereinen Puffer unterscheidet und daß sich auch die Zellmembran in einem anderen metabolischen Zustand befinden muß.

Deshalb wurde es für sehr wichtig erachtet, zum Studium der Anzahl und der Reaktivität von funktionellen Gruppen der intakten Asciteszelloberfläche eine glucosereiche Puffermischung zu verwenden.

Wie stark sich unterschiedliche Versuchstemperaturen auf die Zellen und das Verhalten ihrer Membranen auswirken, verdeutlichen die parallel für drei Temperaturen durchgeführten Experimente.

So ist die Primärreaktion der Zelle mit dem Disulfid bei 12°C nur zu 15 % niedriger, dagegen die Extinktion des Überstandes mit Cystein um 80 % niedriger als bei 37°C . Bei der Suche nach einer Erklärung für diese Differenz muß man berücksichtigen, daß auch im Überstand vorhandene Zellinhaltsstoffe eine positive Reaktion mit dem Disulfid ergeben. Es muß sogar angenommen werden, daß bei der von den physiologischen Bedingungen stark abweichenden Temperatur von 12°C der Anteil lysierten Zellmaterials höher liegt als bei 37°C . Dies könnte ebenfalls die Ursache für die stark erniedrigte Extinktion im Sekundäransatz sein, nämlich dann, wenn mehr niedermolekulare SH-Verbindungen der Zelle, z.B. Glutathion, extrazellulär auftreten, die bereits während der Waschvorgänge einen Teil des gemischten Disulfids zwischen Zelle und Agens reduzieren, das dann bei der Sekundärreaktion nicht mehr zur Verfügung steht.

Dieser Effekt, aber auch eine durch die erniedrigte Temperatur veränderte Reaktionsgeschwindigkeit der Zelloberflächengruppen könnte die aufgezeigten Abweichungen zwischen der Primär- und der Sekundärreaktion bei den eigenen Versuchen, aber auch die Differenz zwischen den eigenen Ergebnissen und denen von GRASSETTI erklären.

Vergleich von DTNB und CPDS bei der SH-Bestimmung

Der von MERISHI und GRASSETTI aufgestellten Behauptung [30, 33, 34], daß das von GRASSETTI erstmals synthetisierte und eingeführte Carboxypyridindisulfid spezifischer und empfindlicher für die reversible Blockierung von SH-Gruppen auf der Zelloberfläche und im Zellhomogenat ist, kann nicht zugestimmt werden. So gibt GRASSETTI an [34], daß er mit DTNB auf der EAT-Zelle nur 35 % der SH-Gruppen nachweisen kann, die er mit CPDS gefunden hat. Zwar wurden in eigenen Untersuchungen mit intakten Zellen auch leichte Differenzen festgestellt, aber dies betraf hauptsächlich die Primärreaktion, in der sich mit DTNB 12 % weniger SH-Funktionen nachweisen ließen. Nach der Abspaltung mit Cystein betrug dieser Unterschied aber nur noch 5 %. Die in Abschnitt 3.2.1.a. mit DTNB und CPDS ermittelten Werte für den säurelöslichen SH Spiegel unterscheiden sich dagegen überhaupt nicht voneinander. Bei der Messung des Gesamt-SH Gehaltes eines Homogenats der verwendeten Zellen lag der mit DTNB ermittelte Wert um 12 % niedriger als der CPDS-Wert. GRASSETTI [34] gibt für ein Asciteszellhomogenat an, daß sich mit DTNB nur 47 % der mit CPDS ermittelten Menge finden lassen. Auch andere Autoren geben für die SH-Bestimmung an Proteinen Differenzen an. So berichten ANDO und STEINER [35], daß die mit CPDS und DTNB ermittelten Werte für den SH Gehalt isolierter Thrombozytenmembranen für ELLMAN Reagenz um 13 % niedriger lagen und daß sich nach Zugabe von Natriumdodecylsulfat die Differenz auf 18 % erhöhte. Daraus ist ersichtlich, daß CPDS mehr proteingebundene SH-Gruppen erfaßt als DTNB.

Aus den eigenen Untersuchungen für die SH-Gruppenbestimmung auf der Zelloberfläche muß der Schluß gezogen werden, daß die Bestimmung im Prinzip genauso gut mit DTNB durchgeführt werden kann. Dies wird gestützt durch die Experimente

zur verlängerten Inkubationszeit der Zellen mit Disulfiden, die daraufhindeuten, daß CPDS gegebenenfalls eher die Membran durchdringt als DTNB, was im Rahmen dieser Bestimmungen aber nicht erwünscht ist.

Der große Vorteil des CPDS dürfte jedoch darin liegen, daß sich bei der Disulfidaustauschreaktion ein stabiles Thion bildet, wohingegen bei der Reaktion mit ELLMAN Reagenz [15] ein reaktives Thiol entsteht, daß zu Folgereaktionen in der Lage ist. Es hat sich jedoch gezeigt, daß sich die Versuchsansätze mit DTNB recht gut standardisieren lassen.

Spontane Spaltung gemischer Disulfide der Zelloberfläche

Die aufgrund eingehender Untersuchungen nachgewiesene Fähigkeit des verwendeten Zellmaterials zur spontanen Reduktion der Disulfidbrücken zwischen Zelle und Pyridinverbindung ohne exogene niedermolekulare Mercaptane war äußerst überraschend. Es ist zwar vorstellbar, daß eine Zelle in der Lage ist, auch die an der Oberfläche liegenden freien SH-Gruppen funktionsfähig zu erhalten, jedoch ist bisher kein Mechanismus bekannt, der dies bewerkstelligen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst versucht, abzugrenzen, in welchem Ausmaß eine Reduktion der künstlich produzierten Disulfide durch Zellinhaltsstoffe stattfindet, die aus lysiertem Material in den Überstand gelangt sind. Auf die mögliche Beteiligung von ehemals intrazellulärem Glutathion wurde bereits hingewiesen. Es konnte jedoch aufgrund von Proteinbestimmungen der Überstände und SH-Bestimmungen mit DTNB errechnet werden, daß nur maximal 10 % des Disulfides während der letzten Inkubation durch vorhandenes Glutathion reduziert werden können. Wenn man davon ausgeht, daß während des Auswaschens und Zentrifugierens ebenfalls Zellen geschädigt werden, so geht mit Sicherheit ein Teil des Oberflächen-

disulfids für die SH-Gruppenbestimmung in der Sekundärreaktion verloren. Weiterhin muß eine Beteiligung von Disulfid umsetzenden Enzymen wie Glutathionreduktase oder eine mit GSH arbeitende Transhydrogenase diskutiert werden.

Beteiligung von Enzymen an der Disulfidspaltung

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glutathionreduktase in Asciteszellen liegt eine neuere Angabe im Rahmen von Untersuchungen über die Änderung der GR Aktivität während der Mitose vor [36]. FREDBORG gibt darin die Aktivität in den von RACKER eingeführten Extinktionseinheiten an, die nach Umrechnung eine spezifische Aktivität von $2,73 \times 10^{-2}$ $\mu\text{Mol GSH/min mg Protein}$ ergeben.

HOSODA [37] ermittelte eine spezifische Aktivität von $3,5 \times 10^{-2}$ $\mu\text{Mol/min mg Protein}$. Die eigenen Ergebnisse stimmen gut damit überein.

Zur Lokalisation der GR liegen auch Untersuchungen an Asciteszellen vor. So findet HOSODA 95 % der Aktivität im löslichen Zellüberstand. BEUTLER [16] gibt für Erythrozyten an, daß dieses Enzym mit ziemlicher Sicherheit im Zytoplasma lokalisiert ist und sofern eine Bindung an Membranen vorliegt, diese sehr locker sein muß.

Daraus kann abgeleitet werden, daß die GR sehr leicht in den Überstand gelangen kann, wenn Zellmembranen geschädigt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, ist die gesamte Aktivität eines Inkubationsüberstandes nur die Folge von Zelllysis und nicht auf eine Verknüpfung mit der Plasmamembran zurückzuführen.

Es ist bekannt, daß die GR ziemlich spezifisch für NADPH ist und daß ihre Aktivität mit NADH um ein vielfaches tiefer liegt [16, 38]. Ob und in welchem Ausmaß die GR auch andere Disulfide umsetzt, wird diskutiert. Im Gegensatz zu ELDJARN und BREMER [39], die gefunden haben, daß

gemischte Disulfide keine Substrate für die GR sind, berichtet BEUTLER [16], daß auch Liponsäure und Disulfide zwischen GSH und Hämoglobin bzw. GSH und Linsenprotein reduziert werden. Für DTNB wurde in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Aktivität der Ascites-Glutathion-reduktase gemessen, die nur 10 % der Aktivität für GSSG betrug

Bei der Untersuchung der Frage, ob die GR auch in der Lage ist, ein gemischtes Disulfid auf der Oberfläche einer Asciteszelle umzusetzen, wurde gefunden, daß die Zugabe von Glutathionreduktase (aus Hefe) und NADPH aber nicht NADH die Werte, die normalerweise für die spontane Reduktion gemessen werden, etwas erhöht. Die mögliche Beteiligung von GR bei der Abspaltung des CPT erscheint im Normalfall fraglich, da dieses Enzym auf NADPH angewiesen ist, dessen Konzentration im Überstand für eine ins Gewicht fallende Abspaltung nicht ausreichen sollte.

Die mögliche Beteiligung einer Transhydrogenase wird im folgenden Kapitel diskutiert.

3.3. Reduktion verschiedener Disulfide durch intakte EAT-Zellen

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Reduktion verschiedener Disulfide durch intakte EAT-Zellen und durch Zellhomogenate sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Da die Disulfidspaltung im allgemeinen innerhalb von 10 Minuten beendet war, wurden die Versuchsansätze nur 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Bestimmung des GSH-Spiegels mit Glyoxalase I im Inkubationsansatz(Zellhomogenat + Cystein) ergab:

für Kontrollzellhomogenat	1,7 nMol SH/10 ⁶ Zellen
für Homogenat + Cystein	1,5 nMol SH/10 ⁶ Zellen

Tab. 3: Reduktion von Disulfiden durch intakte EAT-Zellen und durch Zellhomogenate, Inkubationsdauer 15 min; NPSH Bestimmung im Zellüberstand mit DTNB, bezogen auf 10^6 Zellen; Mittelwerte aus 3 Meßpunkten $\pm$ max. 5 % Standardabweichung

Reagenz	nMol SH/ 10^6 intakte Zellen	nMol SH / Homo- genat aus 10^6 - Zellen	nMol SH / Homo- genat, 5' 10^8
Kontrolle	0,17	2,38	2,73
Cystin	0,08	6,45	7,88
Cystamin	3,24	7,73	10,51
GSSG	0,53	4,26	8,09
Liponsäure	1,75	3,35	-
MEID	4,20	5,80	-
MEMID	4,30	4,70	-
Cystin+NADPH	-	6,32	-
Cystin+NADH	-	6,40	-
Cystamin + NADPH	-	7,82	-
Cystamin + NADH	-	7,62	-
GSSG + NADPH	-	11,80	7,90

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Nicht-Protein-SH Gehalt nach Inkubation von intakten Zellen mit Disulfiden und Mercaptanen sind in Tabelle 4, die Werte für den extrazellulären NPSH Gehalt nach Inkubation mit Mercaptanen in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab. 4: NPSH Gehalt von 10^6 Zellen nach 15 min Inkubation mit Disulfiden und Mercaptanen, bestimmt mit DTNB, gemittelt aus 3 Meßpunkten $\pm$ 5 % max. Standardabweichung.

Reagenz	NPSH Gehalt nMol	NPSH Gehalt in % der Kontrolle
Kontrolle	2,50	100
Cystin	2,75	110
GSSG	2,45	98
MEID	2,40	96
GSH	2,50	100
Cys-SH	2,85	114
Cystin + GSH	3,10	124

Tab. 5: NPSH Gehalt der Inkubationsüberstände von 10^6 Zellen nach 15 min Inkubation mit GSH, Cystein und Cystin, bestimmt mit DTNB, Mittelwerte aus 3 Meßpunkten $\pm$ max. 5 % Standardabweichung; Anfangskonzentration der Reagenzien

Reagenz	Konz.zu Beginn nMol	Extrazell. NPSH nMol
Kontrolle	-	0,19
Cystin	6,75	0,09
GSH	1,35	1,26
Cys-SH	1,35	0,15
Cystin + GSH	6,75 1,35	0,10

Wie den Tabellen zu entnehmen ist, war in den mit GSH inkubierten Ansätzen nach 15 Minuten noch über 90 % der angebotenen Glutathionmenge im Überstand nachweisbar. Das gesamte GSH verschwand aber, wenn gleichzeitig Cystin zugegeben wurde. Von der angebotenen Menge Cystein war nach 15 Minuten nichts mehr im Überstand zu finden. Darüberhinaus zeigten diese Ansätze einen gegenüber der Kontrolle erniedrigten extrazellulären Nicht-Protein-SH Gehalt. Nur 12 % des angebotenen und außen nicht mehr nachweisbaren Cysteins wurden in der Zelle als Nicht-Protein-SH wiedergefunden.

3.3.1. Diskussion

Disulfid reduzierende Enzymsysteme

Reduktasen

Mit dem Phänomen eines spontanen SH-SS Austausches zwischen niedermolekularen Mercaptanen und Disulfiden aber auch zwischen diesen Verbindungen und Proteinen haben sich bereits PHIL und ELDJARN [40] Mitte der fünfziger Jahre intensiv befaßt. Das Ziel dieser und späterer Untersuchungen war, experimentell die Angriffspunkte radioaktiver Strahlen an SH und S-S-Funktionen im Organismus nachzuweisen, den Einfluß von Sensibilisatoren zu untersuchen und mögliche Schutzreagenzien zu finden. Eine Übersicht gibt JOCELYN [41]. Parallel dazu versuchte man, Aufschluß über diejenigen enzymatischen Aktivitäten zu erhalten, die für die Aufrechterhaltung des SH-SS Gleichgewichts in der Zelle verantwortlich sind [42]. So wurden neben der seit langem bekannten Glutathionreduktase zunächst an Pflanzen, Bakterien und Hefe, später auch an

höheren Organismen verschiedene Pyridinnukleotid abhängige Reduktasen nachgewiesen, zum Beispiel die NADH:Liponsäure -, die NADPH:Thioredoxin-, die NADH:Cystin- und auch unspezifische NADPH:Acceptor Oxidoreduktase [43, 44]. Über die Spezifität dieser Enzyme bestehen unterschiedliche Auffassungen.

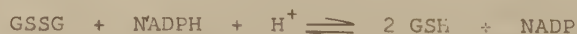
Transhydrogenasen

Ein zweites weit verbreitetes Enzymsystem zur Reduktion von Disulfiden wurde 1955 von RACKER [45] an Rattenleberextrakten entdeckt. Er nannte es Glutathion-Homocystin Transhydrogenase, da Homocystin von den getesteten Disulfiden am besten umgesetzt wurde. Seitdem wurde eine Vielzahl von Transhydrogenasen nachgewiesen und angereichert, so z.B. die GSH-Insulin Transhydrogenase [46, 47] und die CoASSG-Transhydrogenase [48] und andere unspezifische Enzyme [49]. Ob es sich bei den verschiedenen Enzymen um die gleiche Aktivität in unterschiedlichen Reinheitsgraden handelt, und ob auch noch andere Disulfide außer GSSG umgesetzt werden, zu dieser Frage existieren noch keine gesicherten Befunde.

Wie schon von RACKER angegeben wurde, kann die durch die Transhydrogenase katalysierte Reaktion:



nur kontinuierlich ablaufen, wenn das Disulfid - im Falle der mit GSH arbeitenden Transhydrogenase also das GSSG - in einer angeschlossenen Reaktion wieder zu GSH reduziert wird. Hierfür kommt nur die Glutathionreduktase in Frage:



Bei der Interpretation von Befunden zur Reduktion von Disulfiden durch biologisches Material werden die genannten Enzymsysteme immer herangezogen [50, 51].

Reduktion von Cystamin u.a. Disulfiden durch intakte Zellen

ELDJARN et al. [52] postulieren für die Reduktion von Cystamin und anderen Disulfiden durch intakte Erythrozyten folgenden im Hinblick auf die eigene Arbeit bemerkenswerten Reaktionsablauf. Die Verbindungen werden in die Zelle hineintransportiert und hier in einer spontanen Austauschreaktion mit GSH umgesetzt, wobei die Beteiligung einer Transhydrogenase nicht ausgeschlossen wird. Das dabei am Ende entstehende GSSG wird durch die GR wieder reduziert, freies Cystamin läßt sich im Inkubationsüberstand außerhalb der Zellen nachweisen. Da bei Inkubation mit Cystin oder GSSG außen weder Cystein noch Glutathion zu finden sind, nehmen die Autoren an, daß Cystin und GSSG nicht die Zellmembran passieren und folglich auch nicht gespalten werden.

In eigenen Untersuchungen wurde ebenfalls nachgewiesen, daß Cystamin und einige andere Disulfide von intakten EAT-Zellen reduziert werden, wohingegen die Reduktion von Cystin nicht direkt nachweisbar ist und die des GSSG nur begrenzt ablief. Das Ausmaß der Reduktion ändert sich für alle Disulfide, wenn statt der intakten Zellen das Homogenat verwendet wird. Auch für Cystin ist dann eine erhebliche Reduktion feststellbar.

Änderung des Nicht-Protein-SH Gehaltes nach Inkubation mit Disulfiden

Da bei Inkubation der intakten Zellen mit Cystin der NPSH Gehalt innen etwas ansteigt und darüberhinaus exogen

angebotenes Cystein vollständig verschwindet, wird angenommen, daß Cystin ebenfalls von Asciteszellen reduziert wird und das entstehende freie Cystein sofort in die Zelle hineintransportiert wird.

Im Zellinneren wird es offensichtlich über Disulfidbrückenbindung oder adsorbtiv gebunden, was aus dem vollständigen Verschwinden des freien Cysteins aus dem Zellüberstand einerseits und aus der geringen Zunahme des NPSH Spiegels andererseits geschlossen werden muß. Auch MODIG [53] nimmt an, daß EAT-Zellen und andere Zellen über große Bindungskapazitäten für Mercaptane im Zellinneren verfügen. So berechnet er, daß die doppelte Menge von freiem NPSH an Protein gebunden vorliegt. Von den durch Reduktion mit NaBH_4 von Proteinen abgespaltenen niedermolekularen SH-Verbindungen konnte er aber nur 24 % mit der Glyoxalase als GSH identifizieren. Er schließt daraus, daß der Rest freies Cystein ist.

Fähigkeit der Zelloberfläche zur Disulfidreduktion

Da sich mit Mercaptoäthylimidazoldisulfid, das von intakten Zellen hervorragend umgesetzt wird, der NPSH Gehalt in der Zelle überhaupt nicht geändert hat, muß angenommen werden, daß die Reduktion nicht in der Zelle, sondern an der Zelloberfläche vor sich geht und das freie Mercaptan wie auch das freie Glutathion nicht oder nur begrenzt in die Zelle aufgenommen werden.

Der Befund, daß Spaltung und Transport des Cystins in Gegenwart von freiem Glutathion offensichtlich erleichtert werden und daß das außen angebotene Glutathion dabei vollständig verschwindet, läßt die Beteiligung eines spontanen Austausches oder einer Transhydrogenase durchaus zu, jedoch scheinen beide Reaktionen für das Normalzellhomogenat eine untergeordnete Rolle zu spielen, da

hier während der Cystinreduktion der GSH Spiegel, nachgewiesen mit der Glyoxalase, nur um 13 % abnimmt. Die Ergebnisse der Experimente mit zugesetztem NADH und NADPH für Cystin und Cystamin schließen eine ins Gewicht fallende Beteiligung der Glutathionreduktase zudem aus, da aufgrund des hohen Angebotes an reduzierten Coenzymen die Umsatzrate innerhalb von 15 Minuten sichtbar zunehmen müßte. Auch die Beteiligung einer Transhydrogenase, deren Aktivität ja indirekt vom NADH bzw. NADPH Spiegel abhängig ist, kann somit ausgeschlossen werden.

Die relativ große Hitzestabilität der reduzierenden Eigenschaften des Zellhomogenats unterstützt die Annahme, daß keine enzymatische Reaktion primär beteiligt ist.

So unterbleibt nach Hitzeinaktivierung dann auch der normalerweise nach Zugabe von NADPH rapide Anstieg der GSSG Spaltung durch die zelleigene Glutathionreduktase.

Aus all diesen Befunden muß der vorläufige Schluß gezogen werden, daß die Reaktivität der SH-Gruppen auf der Zelloberfläche so groß ist, daß nicht nur die Disulfide DTNB und CPDS gespalten werden, sondern auch weitere physiologische und unphysiologische Disulfide, wobei man zumindestens intermediär die Bildung eines gemischten Disulfids annehmen muß.

Wie die Untersuchungen zur Abspaltung des Carboxypyridinthions von der Zelloberfläche mit und ohne Cystein (Kapitel 3.2.1.c.) gezeigt haben, ist eine lebende Zelle offensichtlich befähigt, die erzwungenen Disulfidbrückenbindungen zwischen ihren Oberflächen-SH-Gruppen und unphysiologischen SH-Reagenzien innerhalb sehr kurzer Zeit wieder zu reduzieren. Nach unseren bisherigen Kenntnissen kann aber die Nachlieferung der bei diesem sekundären Prozeß verbrauchten Reduktionsäquivalente nur durch enzymatische Reaktionen innerhalb der intakten Zelle erfolgen.

3.4. Reaktivität verschiedener SH-Reagenzien gegenüber niedermolekularen Mercaptanen

a) Disulfide

Die Reaktion des 6,6'-(3,3'-Carboxypyridin)-disulfids mit Cystein und Glutathion verlief so schnell, daß ihre Geschwindigkeit mit einem normalen Spektralphotometer nicht gemessen werden konnte. Die Reaktion des 4,4'-(2,2'-Carboxypyridin)-disulfids und des 4,4'-(2,2'-6,6'-Carboxypyridin)-disulfids mit diesen SH-Verbindungen war auch nach Stunden noch nicht beendet.

b) Maleinimide

Die Maleinimide NPM, NiPM und NCPM reagierten ebenfalls sehr schnell mit Cystein und Glutathion. Ansätze, in denen die SH-Reagenzien im Unterschub vorlagen, zeigten, daß NCPM und NPM etwa gleich rasch reagieren, während die Reaktion mit NiPM etwa zehnmal so schnell abläuft. Dies wird auch von SCHÖBERL [54] mitgeteilt.

c) Alkylierungsmittel

Den zeitlichen Verlauf der Reaktion von BAAIP, CAAIP und BASS mit SH-Verbindungen zeigt Abbildung 6 a, die Reaktion von JAC und JAA Abbildung 6 b.

Wie erwartet, besteht zwischen dem Chloracetyl- und dem Bromacetylderivat der Aminoisophtalsäure ein erheblicher Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Synthese der Jodacetylverbindung war ebenfalls versucht worden, lieferte aber kein definiertes Produkt. Bromacetylsulfanilsäure reagiert unter gleichen Bedingungen von allen geprüften Alkylierungsmitteln am schnellsten.

Bedingungen vielleicht auch ganz ausbleibende Permeation durch die Zellmembran, da diese infolge ihrer zahlreichen negativen Gruppen als Anionenbarriere wirkt.

Disulfide

Wenn auch die SH-Gruppen bei der Reaktion mit dem Tetracarboxypyridindisulfid keine irreversible Bindung eingehen, so schien diese Verbindung, über die in den vorliegenden Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um GRASSETTI [55, 56, 57] nichts berichtet wird, zur Blockierung und darüberhinaus zum spektroskopischen Nachweis für SH-Gruppen der Membran sehr geeignet zu sein. Es war zu erwarten, daß die Einführung von zwei weiteren Carboxylgruppen die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zum 6,6'-CPDS herabsetzen würde, jedoch hatte man nicht mit einer sich über Stunden hinziehenden Umsetzung gerechnet. Die durch die vierfach negative Ladung auftretenden großen Abstoßungseffekte als auch sterisch ungünstige Bedingungen könnten den trägen Verlauf erklären. Das 4,4'-CPDS bringt wegen der verlangsamten Reaktion mit SH-Verbindungen gegenüber dem von GRASSETTI eingeführten 6,6'-CPDS keine Vorteile.

Maleinimide

Bei der analog zur Michaeladdition ablaufenden Reaktion von Maleinimiden mit Mercaptanen entsteht eine Thioätherbindung. Da neben der irreversiblen Blockierung viele Maleinimide die Möglichkeit zur quantitativen SH-Gruppen Bestimmung eröffnen, ist zu verstehen, warum so viele Maleinimide synthetisiert und untersucht worden sind. Hervorzuheben wären hier die fluoreszierenden Derivate [58], die für den quantitativen Nachweis gegenüber NEM eine um ein vielfaches gesteigerte Empfindlichkeit bringen sowie bifunktionelle Verbindungen zur Quervernetzung in Proteinen [59] und Untersuchungen über

die lipophilen Eigenschaften verschiedener Maleinimide [60]. Für die vorliegende Problemstellung schien von den untersuchten Maleinimiden nur das N-Carboxyphenylmaleinimid geeignet zu sein, da seine Reaktion mit Glutathion und Cystein so schnell ablief, daß mit sehr kurzen Inkubationszeiten beim Arbeiten mit Zellen gerechnet werden konnte.

α -Halogenacyle

Die vergleichenden Untersuchungen zur Reaktion von Alkylierungsmitteln mit Cystein ergaben, daß von den drei neu eingeführten Verbindungen CAAIP, BAAIP, BASS die beiden Bromderivate nicht langsamer reagierten als das vielfach verwendete Jodacetat und BASS sogar noch geringfügig schnell als JAA. Aus diesem Grund und auch im Hinblick auf die zweifach negative Ladung des BAAIP bzw. die starke Polarität und die damit verbundene schlechte Lipidlöslichkeit der Sulfonsäure erschienen diese Reagenzien für das Arbeiten mit lebenden Zellen besonders interessant zu sein.

3.5. Einfluß der verschiedenen SH-Reagenzien auf den Zellstoffwechsel

a) Disulfide

Die Behandlung von EAT-Zellen nach der 1. Passage in vitro mit 0,75 - 1,5 mM CPDS und DTNB hatte auf Wachstum und Vitalität (Totzahl) der Zellen in der 2. Passage keinen negativen Einfluß. Vermehrung, Totzahl und Lactatproduktion zeigten dieselben Werte wie bei den Kontrollzellen. Morphologische Untersuchungen mit Hilfe des Raster-elektronenmikroskops [33] ließen ebenfalls keine

signifikanten Veränderungen der Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen erkennen.

b) N-Carboxyphenylmaleinimid

Wie die Beobachtung der mit NCPM vorbehandelten Zellen über 10 Stunden in Kultur ergab, wird dieses Agens nur bis zu einer gewissen Konzentration von den Zellen toleriert, ohne daß die Totzahl ansteigt. Die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Prozentsatzes toter Zellen in Kultur ist in Abbildung 7 dargestellt.

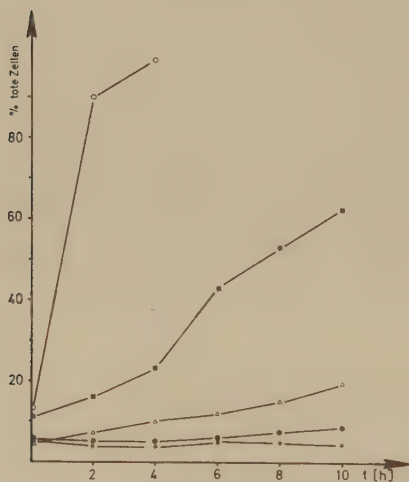


Abb. 7:

Prozentsatz toter Zellen während der 2. Passage nach 5 min Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen von NCPM

- ★ Kontrolle
- 0,375 mM
- △ 0,500 mM
- 0,650 mM
- 0,800 mM

Zur Untersuchung der Auswirkungen des NCPM auf den Zellstoffwechsel (Tab. 6) wurde nur eine Konzentration von 0,375 mM eingesetzt. An den so vorbehandelten Zellen wurden beim Betrachten im Lichtmikroskop morphologische Veränderungen festgestellt. Die normalerweise kugeligen Zellen hatten sich verkleinert und besaßen winzige Ausstülpungen ("Ohren"). Aufgrund dieser Veränderungen

war eine Zelldichtebestimmung mit der Trübungsmessung nicht möglich. Die Extinktion bei 578 nm nahm während der ersten zwei Stunden stark ab, blieb dann konstant und stieg nach 6 Stunden wieder leicht an. Die Bestimmung der Zelldichte durch Auszählen in der Neubauer Kammer erbrachte keine reproduzierbaren Werte, die auf eine echte Vermehrung hindeuteten. Die Zellzahl als Bezugsgröße für die Stoffwechselfparameter war daher mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

Tab.6: Stoffwechselfparameter der Zellen nach Vorbehandlung mit 0,375 mM NCPM, beobachtet über 9 h, Mittelwerte aus je 3 Versuchen

Stoffwechselfparameter	Relativwerte in % der Kontrolle	
	nach 1,5 Stdn.	nach 9 Stdn.
Lactatproduktion	40	80
Na ⁺ Gehalt	190	110
K ⁺ Gehalt	80	90
Thymidineinbau	25	35
Uridineinbau	50	50
AIB-Aufnahme	90	90
O ₂ -Verbrauch	80	80
ATP-ase	90	90

c) Bromacetylsulfanilsäure

Erst bei sehr hohen Konzentrationen des Reagenzes (6 mM) stieg die Zahl der toten Zellen an. Änderungen von Stoffwechselfparametern gegenüber Normalzellen wurden ebenfalls erst bei Inkubation mit hohen Reagenzkonzentrationen beobachtet (Tab. 7).

Tab. 7: Stoffwechselfparameter der Zellen nach 10 min Vorbehandlung mit verschiedenen BASS-Konzentrationen, Mittelwerte aus 3 Versuchen

Stoffwechselfparameter	Reagenzkonzentration in mM				
	0	1,6	4	6	8
% Vermehrungsrate					
2 - 10 h	32	31	21	10	4
10 - 24 h	35	35	29	26	20
% tote Zellen	4	4	5	8	10
Lactat % der Kontrolle					
2 - 10 h	100	97	80-95	65-85	55-75
10 - 24 h	100	100	100	98	95
Atmung % der Kontrolle	100	98	86	80	78
ATP-ase % der Kontrolle	100	100	95	85	85

d) Mercurochrom

Die EAT-Zellen tolerierten diese Quecksilberorganische Verbindung nur in geringen Konzentrationen. Wurden sie mit 0,5 mM MC behandelt, so beobachtete man zunächst eine Zunahme des Proteingehaltes der Überstände und anschließend starke Auflösungserscheinungen der Zellen. Auch bei sehr geringen Konzentrationen des MC wiesen die Zellen die auch für andere Hg-Verbindungen beobachteten morphologischen Veränderungen auf: Ihr Umfang war scheinbar größer, Cytoplasma und Kern hatten sich an einer Stelle konzentriert. Die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen MC-Konzentrationen ist in Abbildung 8 dargestellt.

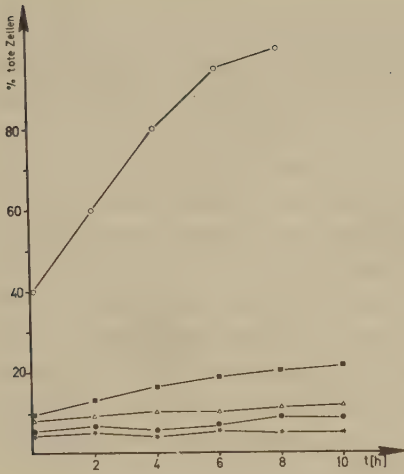


Abb. 8:

Prozentsatz toter Zellen während der 2. Passage nach 5 min Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Mercuriochrom

- ★ Kontrolle
- 0,008 mM
- △ 0,016 mM
- 0,024 mM
- 0,160 mM

Vermehrung und Lactatproduktion wurden nur für zwei Konzentrationen gemessen (Tab. 8).

Tab. 8: Vermehrung und Lactatproduktion nach 5 min Vorbehandlung mit MC 1. 0,008 mM 2. 0,016 mM

Stunden	Kontrolle		1.		2.	
	2-10	10-24	2-10	10-24	2-10	10-24
Vermehrung %	25	31	17	30	13	30
% Tote	6	4	8	6	12	8
% Lactat d.K.	100	100	92-98	100	80-90	100

3.5.1. Diskussion

Wirkung der geprüften SH-Reagenzien auf den Zellstoffwechsel

Disulfide

Über die Auswirkungen von Pyridindisulfiden auf den Stoffwechsel von EAT-Zellen in vivo [61] und in vitro in Pufferlösung liegen von GRASSETTI [32, 55, 56, 62, 63] und POOLE [64] ausführliche Untersuchungen vor. Die eigenen Beobachtungen an Zellen in Kulturmedium bestätigen, daß eine zehnminütige Vorbehandlung mit 0,75 - 1,5 mM CPDS und auch mit DTNB unter den gewählten Bedingungen den Zellstoffwechsel nicht negativ beeinflußt.

Maleinimide

Ganz andere Ergebnisse brachten die Untersuchungen mit NCPM. Schon eine fünfminütige Vorbehandlung mit 0,75 mM ließ alle Zellen innerhalb kurzer Zeit absterben; kein Anstieg der Totzahl war für die Konzentration von 0,375 mM zu beobachten, die zur Untersuchung der Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch Maleinimide gewählt worden war. Das lichtmikroskopische Bild der Zellen läßt vermuten, daß massive Veränderungen in den Membranen durch Maleinimide auftreten, wie sie auch von CARTER [65] für Erythrozyten-ghosts nach Behandlung mit NEM beschrieben werden. Die während 9 Stunden in Kultur gemessenen Stoffwechselparameter deuten auf schwere Schädigungen hin, die aber zum Teil wieder repariert werden. So normalisiert sich die Lactatproduktion wie auch der Na^+/K^+ -Gehalt der Zelle, der typische Veränderungen aufwies, wie sie nach Eingriffen in die Membran [67] oder durch Abkühlung der Zellen allgemein beobachtet werden [68]:

Der Na^+ -Spiegel stieg an, der K^+ -Spiegel fiel ab. Eine Erniedrigung des Kaliumgehaltes soll zu einem Absinken der Glykolyserate führen [69] , so daß auch eine Beeinflußung der Lactatproduktion durch den veränderten Ionen-gehalt möglich sein kann. Der auf 30 % abgesunkene Thymidineinbau bestätigt den Befund der Zellzahlbestimmung, daß sich die Zellen nicht mehr vermehren. Der bei 50 % liegende Uridineinbau deutet an, daß eine Neusynthese von Proteinen noch stattfindet, die im Hinblick auf die nicht sehr in Mitleidenschaft gezogene α -Aminoisobuttersäureaufnahme durchaus möglich sein könnte. Auch der nur um 20 % verringerte Sauerstoffverbrauch zeigt, daß die Energieversorgung des Erhaltungstoffwechsels der Zelle gewährleistet ist. Die kaum betroffene ATP-ase Aktivität überraschte sehr, zumal das mikroskopische Bild starke Veränderungen der Membran und somit vielleicht auch der membrangebundenen Enzymaktivitäten vermuten ließ. Aus diesem Grund wurden später breitere Untersuchungen zur Beeinflußung der ATP-ase Aktivität durchgeführt (Abschnitt 3.8.).

α -Halogenacyle

Die Ergebnisse der Experimente mit BASS machen deutlich, daß es in Konzentrationsbereichen, die bei anderen Reagenzien bereits toxisch wirken, zu keiner nachprüf-
baren Reaktion mit der Asciteszelle kommt. Erst bei Erhöhung der Konzentration auf 4 mM beginnen sich Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel bemerkbar zu machen, die aber mit der Permeation des Reagenzes in Zusammenhang gebracht werden müssen (vgl. Abschnitt 3.6.). Die Weiterführung der Zellen in Kultur über 24 Stunden machte deutlich, daß sich die Zellen, wie auch nach NCPM-Behandlung, wieder erholen und auch wieder deutlich vermehren. Da die Reaktion von SH-Verbindungen mit

Alkylierungsmitteln und Maleinimiden irreversibel ist, kann die Regeneration essentieller SH-Funktionen nicht durch Glutathion oder durch andere intrazelluläre SH-Verbindungen zustandekommen, sondern beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf der Neubildung von Enzymen.

Mercuriochrom

Die Verwendung des u.a. [70] zur Wunddesinfektion eingesetzten Mercuriochroms zum Studium der SH-Gruppen auf der Asciteszelloberfläche ist problematisch, da die Zellen nur äußerst niedrige Konzentrationen tolerieren. Nach Behandlung mit den gewählten Konzentrationen an MC waren die Zellen rot gefärbt. Diese Färbung kann einmal durch Reaktion der Oberflächen-SH-Gruppen mit dem Quecksilber des Reagenzes zustandekommen, aber auch auf unspezifischer Adsorption beruhen, die durch Wechselwirkung mit aromatischen Aminosäuren möglich ist. In jedem Fall ist aber die Membran mit dem Reagenz beladen. Die Vermehrung war um 30 - 40 % abgesunken, während die Lactatproduktion wenig betroffen schien (Senkung um 8 - 20 %) und sich auch sehr schnell wieder erholte. Dies legt die Vermutung nahe, daß das Reagenz die Membran kaum passiert haben dürfte und daß die an der Zelloberfläche ausgebildeten Mercaptidbindungen bald wieder gespalten werden und somit die funktionellen SH-Gruppen der Zelle wieder frei werden. Diese Annahme wird bestätigt durch den Befund, daß die Zellen nach 10 Stunden in der Kultur wieder vollkommen weiß aussahen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Disulfiden, Mercuriverbindungen und Maleinimiden lassen den Schluß zu, daß eine Zellpopulation, deren Totzahl nach Behandlung mit diesen Reagenzien nicht angestiegen ist, nicht nur zur Spaltung von Disulfidbrücken (siehe Abschnitt 3.3.1.)

und Mercaptidbindungen an der Oberfläche der Plasmamembran in der Lage ist, sondern auch die verschiedensten Komponenten, die für den Ablauf von Stoffwechselprozessen durch irreversible Blockierung ausgefallen sind, in relativ kurzer Zeit nachbilden kann.

3.6. Beeinflußung des intrazellulären SH Spiegels

Zur Prüfung der Permeationsfähigkeit der untersuchten SH-Reagenzien wurde als Kriterium der intrazelluläre Nicht-Protein-SH bzw. säurelösliche SH Spiegel herangezogen. Im Falle der neu eingeführten Alkylierungsmittel wurde zusätzlich die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase Aktivität der Asciteszellen geprüft.

3.6.1. Gesamt- und Nicht-Protein-SH Gehalt der Zellen

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der NPSH und Gesamt-SH Spiegel des verwendeten Ascites Tumorstammes bestimmt. Die Ergebnisse sind zusammen mit denen der spezifischen Glutathionbestimmungen in Tabelle 9 dargestellt.

Tab.9: SH-Gehalt des EAT-Zellstammes von KARZEL

Art d.SH Verbind.	Methode	Zahl der Messungen	nMol ·SH/10 ⁶ Zellen
GSH	Alloxan	6	2,82 ± 0,30
	Glyox. I	10	2,00 ± 0,20
NPSH	CPDS	10	2,87 ± 0,25
	DTNB	20	2,85 ± 0,25
Total	CPDS	6	16,50 ± 0,25
	DTNB	6	14,50 ± 0,15

Auswirkungen der SH-Reagenzien auf den NPSH Spiegel

Da die für Glutation spezifischen Bestimmungsmethoden so viel Zeit beanspruchen, daß die Ergebnisse aufgrund des langen Stehens der Proben vor dem eigentlichen Test durch Autoxidationsprozeße verfälscht werden können, wurde der NPSH Gehalt bei großen Versuchsreihen mit DTNB bestimmt und ergab die in Tabelle 10 angegebenen Werte.

Reagenz	Konz. mM	Inkub. min	% SH der Kontrolle	
JAC	0,8	5	86	$\pm$ 2
	1,6	5	78	$\pm$ 2
JAA	0,8	5	64	$\pm$ 3
	1,6	5	41	$\pm$ 2
BASS	0,8	10	100	$\pm$ 2
	1,6	10	98	$\pm$ 2
	8,0	10	85	$\pm$ 4
BAAIP	0,8	10	98	$\pm$ 3
	1,6	10	97	$\pm$ 3
	8,0	10	75	$\pm$ 4
NEM	0,8	5	10	$\pm$ 1
	1,6	5	6	$\pm$ 0,5
NCPM	0,4	5	85	$\pm$ 5
	0,8	5	60	$\pm$ 3
	1,6	5	17	$\pm$ 2
pCMB	0,08	5	92	$\pm$ 7
pCMBS	0,08	5	100	$\pm$ 3
	0,16	5	104	$\pm$ 10

Tab. 10: NPSH Gehalt von EAT-Zellen nach Vorinkubation mit verschiedenen SH-Blockern, gemessen mit DTNB, ausgedrückt in % des Normalwertes, je 8 Bestimmungen $\pm$ Standardabweichungen

3.6.2. Wirkung von Alkylierungsmitteln auf die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

Spezifische Aktivität in EAT-Zellen:

Die Ermittlung der spezifischen GAPDH-Aktivität in Zellen, die 4 Stunden in der 2. Passage angezüchtet waren, ergab:

$$1,5 \pm 0,2 \mu\text{Mol} / \text{min mg Protein}$$

Die nach Vorinkubation mit BASS und BAAIP noch vorhandenen Enzymaktivitäten sind in den Tabellen 11 und 12 zusammengefaßt. Die GAPDH-Aktivität der mit 0,8 mM JAC vorbehandelten Zellen lag noch bei 48 % der Kontrollen.

Tab. 11: Vermehrung, Vitalität, Lactatproduktion und GAPDH Aktivität von Zellen in der 2. Passage nach Vorbehandlung mit 8 mM BASS und BAAIP

Parameter	BASS		BAAIP	
	2 h	6 h	2 h	6 h
Vermehrung %	0	5	0	8
% Tote	3	10	3	10
Lactat: % d.K.	50	80	45	85
GAPDH % d.K.	57	70	60	70

Tab. 12: GAPDH Aktivität nach Inkubation von Zellen mit verschiedenen BAAIP Konzentrationen

Konz. mM	0,08	0,8	8	16
Aktivität % d. K.	100	90	50	48

3.6.3. Diskussion

NPSH Gehalt von Ascites Zellen

Der intrazelluläre NPSH und GSH Gehalt von Ascites Tumorzellen ist oft gemessen worden, insbesondere in Abhängigkeit vom Zellzyklus [71] und im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Auswirkung radioaktiver Bestrahlung [72, 73] und hohen Sauerstoffdrucken [74]. Es ist nicht immer möglich, die eigenen Befunde mit Literaturangaben zu vergleichen, da, abgesehen von den unterschiedlichen Ascites Tumorstämmen, die Bezugsgröße nicht einheitlich gewählt wird. So beziehen verschiedene Autoren den NPSH Gehalt, aber auch andere Meßgrößen auf das Trocken- oder Naßgewicht, auf ml dicht gepackte Zellen oder auf den Hämatocrit-Wert der Ascites-Zellen. Für Bestimmungen mit der Zellzahl als Bezugsgröße, die entweder mit einer Zählkammer oder mit einem Coulter Counter ermittelt wurden, liegen folgende Angaben vor:

REVESZ et al. [72] ELD-Ascites:	NPSH 2,48 nMol/ 10^6 Z
	GSH 2,42 nMol/ 10^6 Z
GRONOW [73] Lettrê-Ascites:	NPSH 4,04 nMol/ 10^6 Z
HARRIS [71] ELD-Ascites:	NPSH 2,50 nMol/ 10^6 Z

Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte NPSH Spiegel des verwendeten Tumorzellstammes von 2,8 nMol/ 10^6 Zellen fügt sich in diese Reihe gut ein.

Anteil des Glutation am Nicht-Protein-SH Gehalt

Laut Literaturangaben [53, 75] soll im allgemeinen der Anteil des GSH am NPSH Gehalt der Zelle mindestens 90 % betragen, die restlichen 10 % verteilen sich auf Cystein und andere nicht identifizierte Stoffe. Nach den eigenen

Ergebnissen der enzymatischen Glutathionbestimmung mit der Glyoxalase beträgt dieser Prozentsatz aber nur 70 %, während die mit Alloxan ermittelten Glutathion Konzentrationen mit dem Nicht-Protein-SH Spiegel, der mit den Disulfidreagenzien gefunden wurde, übereinstimmen.

Da durch die PCA-Behandlung der Proben alle säurelöslichen SH-Verbindungen in den Überstand gelangen, muß angenommen werden, daß der NPSH Spiegel tatsächlich nicht mit dem GSH Spiegel übereinstimmt. Es ist durchaus denkbar, daß mit Alloxan auch noch andere SH-Verbindungen erfaßt wurden, daß aber andererseits der mit der Glyoxalase ermittelte 70 %ige Anteil des GSH am NPSH zu niedrig liegt, obwohl diese Methode allgemein als sehr zuverlässig gilt.

Den viel diskutierten Angaben von BEUTLER [76], daß bei Enteiweißung mit Perchlorsäure ein erheblicher Teil des Glutathions durch Oxidation verloren ginge, wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls nachgegangen.

Es steht fest, daß reinste Perchlorsäure in wässriger Lösung nicht oxidierend wirkt, daß aber niedrigere Oxidationsstufen des Chlors wie zum Beispiel ClO_2 , die als Verunreinigung auch in p.a. Präparaten vorhanden sein können, SH-Gruppen oxidieren.*) In eigenen Untersuchungen wurde festgestellt, daß eine definierte Lösung von GSH in Puffer nach Zugabe von PCA, 15-minütigem Stehen im Eisbad und Neutralisation, den gleichen SH Gehalt aufwies wie eine mit Puffer entsprechend verdünnte Vergleichslösung. So konnte angenommen werden, daß die während der gesamten Arbeit verwendete PCA-charge die Bestimmung des intrazellulären, säurelöslichen SH Spiegels nicht beeinträchtigt hat.

*) Privatdozent Dr. L. Flohe, persönliche Mitteilung

Intrazellulärer SH-Gehalt nach Behandlung mit SH-Blockern

Die Messung des intrazellulären NPSH Gehaltes nach Behandlung der Zellen mit SH-Blockern macht ein unterschiedliches Permeationsverhalten der Substanzen deutlich. So wirkt sich bereits die Einführung einer freien Carboxylgruppe in die Verbindung und die dadurch erhöhte Polarität und verminderte Lipidlöslichkeit deutlich aus wie der Vergleich Jodacetamid/Jodacetat, N-Äthylmaleinimid/N-Carboxyphenylmaleinimid demonstriert. Die Ergebnisse mit den Alkylierungsmitteln BASS und BAAIP entsprechen den Befunden der Stoffwechseluntersuchungen. Die Reagenzien permeieren offensichtlich oberhalb einer Konzentration von 2 mM. Man gewinnt allerdings den Eindruck, als ob die Bromacetylsulfanilsäure bei gleicher Konzentration die Membran etwas weniger gut passiert als die Bromacetylaminoisophtalsäure. Das gleiche ist für pCMB und pCMBS zu beobachten. Der Befund, daß die Mercurisulfonsäure im Vergleich zur Mercuribenzoesäure die Membran nicht durchdringt, deckt sich mit den Angaben von VANSTEVENICK et al. [77] und SUTHERLAND et al. [78], die sich bei Untersuchungen des Glucose- und Ionentransports an intakten Erythrozyten mit verschiedenen quecksilberhaltigen SH-Blockern auseinandergesetzt haben. Die unterschiedlichen Permeationseigenschaften der beiden Verbindungen pCMB und pCMBS werden hier mit der weitaus schlechteren Lipidlöslichkeit der hydrophilen Sulfonsäure erklärt.

Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

Die GAPDH stellt mir ihren für die Katalyse essentiellen SH-Gruppen das gegenüber SH-Reagenzien empfindlichste Enzym der Glykolyse dar. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, über die Messung der Enzymaktivität zu entscheiden, ob und in welchem Umfang ein für SH-Gruppen

spezifisches Reagenz die Membran passiert hat.

Die Messungen der GAPDH-Aktivität nach Vorinkubation der EAT-Zellen mit BASS und BAAIP bestätigen die Befunde der Stoffwechseluntersuchungen und der NPSH Bestimmung, daß beobachtete Veränderungen im Zellstoffwechsel auch auf eingedrungenen SH-Blockern beruhen. Sie zeigen darüberhinaus, daß BAAIP bereits bei einer Konzentration kleiner als 0,8 mM die Zellmembran passiert und nicht erst oberhalb einer Konzentration von 1,6 mM, wie aufgrund der NPSH Bestimmungen anzunehmen war.

Beim Versuch, den Befund zu deuten, daß die GAPDH als Indikator für eingedrungene SH-Blocker sensibler ist als der NPSH Spiegel einer Zelle, muß man folgende Überlegungen anstellen: Ein Teil des in der Zelle vorkommenden GSH ist an Protein gebunden, sei es über Disulfidbrücken [75] oder auch adsorptiv. So wird heute eine feste, aber nicht kovalente Bindung von Glutathion an Protein für verschiedene Enzyme angenommen. Für die GAPDH konnte erst 1963 [79] nachgewiesen werden, daß das in Enzympräparationen stets anwesende GSH unspezifisch, d.h. nicht über eine Disulfidbrücke am Enzymprotein gebunden ist. Man kann also annehmen, daß ein Teil des GSH nicht frei im Cytoplasma vorliegt.

Im Falle einer Belastung des GSH Spiegels, also z.B. bei der Reaktion mit eingedrungenen Alkylierungsmitteln, wird vermutlich diese Glutathionreserve mobilisiert. Die Folge davon ist, daß man im Testansatz nach vorausgegangenem Auswaschen und Aufschluß der Zellen den Abfall des NPSH Spiegels nicht im tatsächlichen Ausmaß erfaßt.

Von dieser Annahme ausgehend wären die SH-Gruppen im aktiven Zentrum der GAPDH nicht unbedingt als "empfindlicher" zu bezeichnen. Nach der irreversiblen Reaktion mit einem Alkylierungsmittel findet zwischen Zellaufschluß und Aktivitätstest keine Neusynthese des Enzyms mehr statt, so daß die Hemmung in vollem Umfang erfaßt

wird und es daher so aussieht, als sei das Enzym stärker betroffen als Glutathion. Inwieweit der an Erythrozyten erhobene Befund, daß ein Teil der GAPDH an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist [80] auf andere Zelltypen übertragbar ist und welche Schlußfolgerungen für die Reaktion mit eingedrungenen SH-Reagenzien daraus gezogen werden können, kann hier nicht beantwortet werden.

Bei der Messung der GAPDH Aktivität und der Lactatproduktion über 24 Stunden wurden parallele Effekte festgestellt. Danach ist die beobachtete Erniedrigung der Lactatproduktion auf jeden Fall auch durch eine herabgesetzte GAPDH Aktivität bedingt. Wenn im Laufe des Versuchs sowohl die GAPDH Aktivität als auch die Lactatproduktion wieder ansteigt, dann ist dies nur aufgrund einer Neusynthese der GAPDH und anderer betroffener Glykolyseenzyme denkbar.

Wenn man die Ergebnisse der Messungen mit Jodacetat und BAAIP bzw. BASS vergleicht, wird deutlich, daß neben den Ladungen eines Moleküls auch dessen Gesamtstruktur von Bedeutung ist. Die Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der GAPDH durch SH-Blocker machen darüberhinaus deutlich, daß es wohl kaum ein niedermolekulares Reagenz geben dürfte, für das die Membran einer lebenden Säugerzelle völlig impermeabel ist.

3.7. Wirkung verschiedener SH-Reagenzien auf die Anzahl der Oberflächen-SH-Gruppen lebender Zellen

a) Unterschied zwischen Maus- und Kulturzellen

Es wurde zunächst untersucht, ob sich die Anzahl der frei zugänglichen SH-Gruppen auf der Oberfläche von Kulturzellen von derjenigen auf der Oberfläche von frisch

abpunktierten Zellen unterscheidet.

Die Inkubation von Zellen mit DTNB über 10 Minuten ergab

1. Kulturzellen 1,51 $\pm$ 0,2 nMol SH / 10^6 Zellen
2. Maus-Ascites 1,52 $\pm$ 0,2 nMol SH / 10^6 Zellen

Es wurden 15 Versuche mit je 4 Bestimmungsansätzen für Kulturzellen neben je 4 Ansätzen für Maus-Asciteszellen durchgeführt.

Aus dem Ergebnis kann man schließen, daß es zwischen Kulturzellen der 1. Passage und gleich alten in der Maus gehaltenen Zellen keinen Unterschied im Bereich der auf der Oberfläche für DTNB frei zugänglichen SH-Funktionen gibt. Die Untersuchungen zur Reaktivität der SH-Gruppen durch exogen zugegebene Substanzen wurden daher an Zellen unmittelbar nach der Entnahme aus der Maus durchgeführt.

b) Messung der Oberflächen-SH-Gruppen mit CPDS

Eine Übersicht über das Ausmaß der Blockierung von Oberflächen-SH-Gruppen durch verschiedene SH-Blocker gibt Tabelle 13.

Tab. 13: Reaktion von EAT-Zellen mit CPDS (1 mM, 10 min) nach Vorbehandlung mit SH-Blockern. Die Anzahl der verbliebenen freien SH-Funktionen ist in % der Kontrollzellen ausgedrückt. Mittelwerte aus 8 Versuchen $\pm$ Standardabweichung

Reagenz	Konz. mM	Inkub. min	% SH der Kontrolle	
JAC	0,8	5	68	$\pm$ 4
JAA	0,8	5	60	$\pm$ 5
BASS	0,8	10	93	$\pm$ 5
BAAIP	0,8	10	98	$\pm$ 6
NEM	0,8	5	30	$\pm$ 4
NCPM	0,8	5	70	$\pm$ 7
pCMB	0,08	5	98	$\pm$ 10
pCMBS	0,08	5	102	$\pm$ 10

c) Versuch eines Nachweises der SH-Blockierung im
elektronenmikroskopischen Bild

Die Elektronenmikroskopie sollte zur Klärung der Frage, in welchem Umfang SH-Gruppen auf der Zelloberfläche blockiert werden können, herangezogen werden. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit NEM vorbehandelt, da bei der Messung mit CPDS festgestellt worden war, daß NEM die Zahl der erfaßbaren SH-Gruppen am stärksten reduziert. Beim Arbeiten mit Acetoxy-mercuriphenyl-Azo-ferritin, einem elektronenmikroskopisch nachweisbaren SH-Blocker [22], wurden folgende Beobachtungen gemacht: Nach dem Auswaschen des Ferritins waren Zellen, die mit dem nicht modifizierten Ferritin behandelt worden waren (I) vollkommen farblos, die anderen beiden Zellproben, ohne NEM (II) und mit NEM (III), gelb-orange gefärbt. Diese beiden (II und III) setzten sich bei der Zentrifugation nicht gut ab.

Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, daß die Membranoberfläche der Zellen II und III dicht mit Azoferritin besetzt war. Darüberhinaus fanden sich aber auch, insbesondere bei III, Ferritin Moleküle innerhalb mancher Zellen, so daß angenommen werden muß, daß das hochmolekulare Ferritin aufgrund von Membranschädigungen in die Zelle gelangt ist. Im Präparat waren viele nicht intakte Zellen sichtbar. Pinozytose, wie sie für Ferritin an anderen Zellen [81] beobachtet wurde, kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Da verschiedene Regionen im gleichen Präparat gar nicht markiert waren, muß angenommen werden, daß es schon während der Inkubation mit Azoferritin zur Bildung von Zellaggregaten gekommen ist, so daß einige Zellen überhaupt nicht mit dem Agens in Kontakt gekommen sind. Bei den Zellen, die mit nicht modifiziertem Ferritin behandelt worden waren, ließ sich keine Ferritinmarkierung an der Oberfläche nachweisen,

was mit den visuellen Befunden übereinstimmte. Ob Ferritin nicht auch in dieser Probe in das Zellinnere eingedrungen war, läßt sich mit absoluter Sicherheit anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht ausschließen.

3.7.1. Diskussion

Zur quantitativen Bestimmung von SH-Gruppen an der Oberfläche lebender Zellen

Von GRASSETTI und MERISHI liegen verschiedene Veröffentlichungen zur Bestimmung von SH-Gruppen auf der Oberfläche von intakten Säugerzellen, u.a. Lymphozyten, Thrombozyten und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen vor [14, 30, 33]. Dagegen liegen bisher keine Untersuchungen zu der Frage vor, inwieweit die für das Studium des Energiestoffwechsels und als Cytostatika verwendeten SH-Blocker vom Typ des N-Äthylmaleinimids, Jodacetamids, Jodacetats u.a. [82, 83, 84] ihre Wirkungen an lebenden Zellen bereits durch Blockierung von SH-Gruppen der Zellmembran entfalten. Das ist deshalb besonders erstaunlich, weil man sich kaum vorstellen kann, daß SH-Blocker in eine Zelle eindringen, ohne bereits vorher einen Teil der SH-Gruppen der Zelloberfläche blockiert zu haben.

Die Bestimmung der Oberflächen SH-Gruppen nach GRASSETTI, die in Abschnitt 3.1.a. ausführlich erläutert wurde, wurde so modifiziert, daß man das bei der Reaktion von intakten Zellen mit CPDS entstehende Carboxypyridinthion als Maß für die erfaßbaren SH-Funktionen der Zelloberfläche nimmt und nicht den Anteil, der nach intensivem Waschen durch Inkubation mit Cystein wieder angespalten wird. Dadurch war es möglich, mit wesentlich weniger Zellmaterial auszukommen, denn die nach den beiden Verfahren ermittelten Extinktionen unterschieden sich etwa um den Faktor drei bis fünf. Außerdem waren die folgenden

Überlegungen entscheidend:

Zur vollständigen Entfernung des Reagenzes müssen die Zellen dreimal gewaschen werden und nach der GRASSETTI-Bestimmungsmethode sind zusätzlich drei Waschvorgänge nötig. Schon unter Normalbedingungen kommt es durch das ungewohnte Puffermilieu und die mechanische Beanspruchung der Zelle infolge Zentrifugation und Resuspension zur Zellysis. Nach Einwirkung von SH-Reagenzien wird darüberhinaus die Zellmembran zusätzlich stark belastet. Aus diesem Grund hielt man die Originalmethode nach GRASSETTI, die schon bei nicht vorbehandelten Zellen hohe Streuungen aufwies, für nicht geeignet und führte daher die Bestimmung in der abgekürzten Form durch.

Hierbei muß allerdings der Nachteil akzeptiert werden, daß die nach Umsetzung der Zellen mit CPDS auftretende Extinktion des Überstandes zum Teil auf der Reaktion des Disulfids mit intrazellulären SH-Gruppen untergegangener Zellen, die in jedem Pufferinkubationsansatz zu finden sind, beruht.

Wirkung von SH-Reagenzien auf Oberflächen SH-Gruppen von Zellen

Die in Tabelle 13 zusammengefaßten Ergebnisse beweisen, daß reaktive SH-Reagenzien, die durch die Membran ins Zellinnere aufgenommen werden, bereits vor oder während des Transports in erheblichem Umfang mit den SH-Gruppen der Membranproteine reagieren. Dies zeigen die Versuche mit NEM besonders deutlich, das sowohl den intrazellulären NPSH Spiegel als auch die externen SH-Funktionen am stärksten erniedrigt (Tabelle 10 und 13). Für das N-Carboxyphenylmaleinimid ist das Ausmaß der Reaktion sowohl innen wie außen deutlich vermindert. Auch mit Jodacetat findet man, daß es zur Alkylierung der SH-

Gruppen auf der Zelloberfläche führt, obwohl SMITH und ELLMAN [60] für Erythrozyten mitteilen, daß Jodacetat und Jodacetamid so schnell die Membran passieren und mit den intrazellulären SH-Verbindungen reagieren, daß es zu keiner nachprüfbaren Reaktion mit der Membran kommt. Das Ausmaß der Reaktion auf der Zelloberfläche bestimmten sie über den Glucose-efflux, bei dem eine Beteiligung von SH-Gruppen angenommen wird.

BASS und BAAIP zeigen für Konzentrationen, bei denen noch keine Permeation zu beobachten ist, außen nur eine sehr geringe Wirkung. Da die Reaktionsgeschwindigkeiten der Umsetzung dieser Verbindungen mit niedermolekularen SH-Verbindungen nicht niedriger liegen als für Jodacetat und Jodacetamid, läßt sich ihr Verhalten am einfachsten mit sterischen Faktoren erklären.

Wie aus einigen Mitteilungen hervorgeht, hat man den Versuch unternommen, die durch verschiedene Reagenzien in unterschiedlichem Ausmaß blockierten SH-Gruppen der Membran in Klassen zu unterteilen [65, 78, 85]. Inwiefern diese Vorstellungen den tatsächlichen Gegebenheiten der Membranstruktur entsprechen, läßt sich aufgrund der bisherigen Kenntnisse nicht entscheiden.

Quecksilberhaltige SH-Blocker

CARTER [65] gibt an, daß mit pCMBS andere SH-Gruppen auf der Erythrozytenoberfläche reagieren als mit NEM. Die eigenen Befunde, daß mit den als äußerst reaktiv bekannten Verbindungen pCMB und pCMBS so gut wie überhaupt keine Reaktion an der Oberfläche nachweisbar ist, entsprachen daher nicht den Erwartungen. Darüberhinaus stieg die Anzahl der SH-Funktionen nach Behandlung mit pCMBS auf über 100 % der Kontrollwerte an, wobei man allerdings die starken Streuungen nicht übersehen darf.

Zur Interpretation dieser Befunde müssen neuere Literaturhinweise über die Wirkung von anorganischen und organischen

Quecksilberverbindungen auf isolierte Membranen und auf Zellen herangezogen werden. So konnte man nachweisen, daß es unter Einfluß dieser Reagenzien zu tiefgreifenden Veränderungen in der Membran kommt, die bei höheren Konzentrationen bis zum Herauslösen ganzer Proteinbezirke aus der Membran führen können [65, 85]. Man könnte sich vorstellen, daß pCMB die Membran derart verändert, daß zahlreiche SH-Gruppen, die vorher nicht unmittelbar zugänglich waren, nun für das CPDS erreichbar sind und deswegen keine Abnahme der E 344 nm zu beobachten war. Zusätzlich muß man wohl annehmen, daß es auch bei Verwendung so geringer Konzentrationen, die nicht zu einer sichtbaren Erhöhung der Zahl der toten Zellen führen, nach dem Auswaschen als Auswirkung der an oder in der Membran gebundenen Reagenzmoleküle noch zu einer Ablösung von Protein kommt, das dann im Überstand mit dem CPDS reagiert. Es liegt die Vermutung nahe, daß beide Effekte sich addieren, aber nicht klar gegeneinander abgrenzbar sind. Dies würde auch die hohen Standardabweichungen erklären. Um die Reaktion von Mercuriverbindungen mit Oberflächen-SH-Gruppen besser und genauer zu quantifizieren, müßte eine andere Nachweismethode, die Verwendung von ^{203}Hg markierten Reagenzien herangezogen werden.

Elektronenmikroskopie

Die von HASSELBACH [22] veröffentlichten elektronenmikroskopischen Aufnahmen vom Sarkotubularsystem demonstrieren in eindrucksvoller Weise den Unterschied zwischen Präparaten mit und ohne NEM Behandlung.

In dieser Arbeit war der Versuch unternommen worden, diese Methodik auf lebende Ehrlich-Ascites-Tumorzellen zu übertragen, um die Befunde zur Blockierung von Oberflächen-SH-Gruppen auch morphologisch abzusichern.

Anhand der beschriebenen Ergebnisse kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob an der Oberfläche der mit NEM inkubierten Zellen weniger Azoferritin gebunden wird als an Normalzellen. Es wird angenommen, daß es in beiden Fällen zur unspezifischen Anlagerung des Azoferritins gekommen ist; diese Erscheinung war aber bei der mit nativem Ferritin inkubierten Zellprobe nicht zu sehen. Das anormale Verhalten der Zellen bei der Zentrifugation macht deutlich, daß Quecksilberphenyl-Azoferritin in der verwendeten Konzentration die Membraneigenschaften einer lebenden Zelle in erheblichem Umfang verändert und daß eine vorangegangene weitgehende Blockierung der SH-Funktionen für diesen Vorgang keine Bedeutung zu haben scheint. Obwohl die Verwendung von hochmolekularen Quecksilberverbindungen zur Blockierung von SH-Funktionen als sehr aussichtsreich angesehen wird [86, 87], wurden in dieser Arbeit keine weiteren Experimente mit Quecksilberphenyl-Azoferritin durchgeführt. Die Dosierung des hochmolekularen Ferritins hat sich aufgrund seines multifunktionellen Charakters als sehr problematisch erwiesen. Die anschließende Auswertung über die Elektronenmikroskopie wird für Versuche, bei denen eine Vielzahl von Proben anfällt, als zu aufwendig betrachtet. Ausschlaggebend aber waren die grundsätzlichen Bedenken, die während verschiedener Experimente innerhalb der vorliegenden Arbeit gegen die Verwendung von Mercuriverbindungen beim Arbeiten mit nativen Zellen entstanden sind.

3.8. Membrangebundene SH-Enzyme

Nach bisherigen Vorstellungen ist die volle Aktivität der in die Zellmembran integrierten ATP-asen und damit verbundenen Phosphatasen von freien SH-Gruppen abhängig [82, 88, 89]

a) Adenosintriphosphatase

Der verwendete Asciteszellstamm ließ die Messung einer $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -abhängigen ATP-ase Aktivität an intakten Zellen zu. Die Ergebnisse sind zusammen mit denen für beschalltes Zellmaterial und denen unter Einfluß von SH-Blockern in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tab. 14: ATP-ase Aktivität von intakten (mit und ohne Cyanid im Inkubationsmedium) und beschallten EAT-Zellen in nMol abgespaltenes Phosphat / 10^6 Zellen; Einfluß von Inhibitoren, alle 0,1 mM

	Zahl d. Versuche	nMol PO_4 / 10^6 Zellen 30 min	Restakti- vität %
Beschallte Zellen	8	330 $\pm$ 13	-
Intakte Zellen (+ CN)	9	228 $\pm$ 27	-
Intakte Zellen (o CN)	25	225 $\pm$ 20	100
JAC	6	176 $\pm$ 18	78
BASS	6	200 $\pm$ 25	89
BAAIP	6	202 $\pm$ 11	90
NEM	6	180 $\pm$ 18	80
NCPM	6	193 $\pm$ 25	86
pCMB	6	171 $\pm$ 20	76
pCMBS	6	180 $\pm$ 18	80
CPDS	6	195 $\pm$ 14	87
DTNB	6	198 $\pm$ 13	88
Quabain	3	204 $\pm$ 10	91

b) p-Nitrophenylphosphatase

Mit einigen Voruntersuchungen sollten zunächst die optimalen Bedingungen für die Bestimmung der pNPP-ase Aktivität und ihre Hemmbarkeit ermittelt werden.

Die Aktivität von intakten Zellen in verschiedenen Puffern gibt Tabelle 15 an, die Aktivität in einer von der ATP-ase Messung übernommenen Inkubationslösung bei verschiedenen pH-Werten zeigt Abbildung 9.

Tab. 15: p-Nitrophenylphosphatase Aktivität von intakten EAT-Zellen in verschiedenen Puffern

Puffersystem	pH	nMol pNP/10 ⁷ Zellen 30 min	% Tote
Inkubations- lösung	7,5	85	10
Ringer	6,9	26	8
Tris	7,4	23	18
KRB o.PO ₄	7,3	22	10
Cholinchlorid	7,4	34	9
Gly/Imid.	7,5	40	10

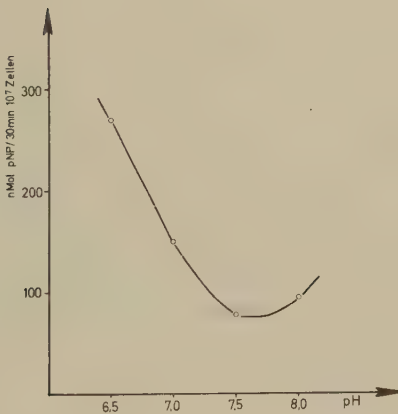


Abb. 9:

Abhängigkeit der pNPP-ase Aktivität von intakten EAT-Zellen vom pH-Wert der Inkubationslösung

Die pNPP-ase Aktivität war in Cyanid freier Inkubationslösung, die auch für die ATP-ase Bestimmungen verwendet wurde, am größten. Aus dem pH-Aktivitätsprofil ist zu entnehmen, daß die Aktivität im sauren pH-Bereich größer ist als im neutralen und daß sie im alkalischen wieder leicht ansteigt. Um die Auswirkungen von SH-blockierenden Reagenzien auf die pNPP-ase Aktivität zu testen, wurde in Inkubationslösung bei pH 7,0 gearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgenommen. Wie daraus zu entnehmen ist,

Tab. 16 : pNPP-ase Aktivität von intakten EAT-Zellen unter Normalbedingungen und in Gegenwart von Inhibitoren, ⁷alle 0,1 mM, in nMol abgespaltenes pNP/10⁷ Zellen

	Zahl der Versuche	nMol pNP / 10 ⁷ Zellen 30 min		Restaktivität %
o.Inhib.	40	153	<u>+</u> 27	100
JAC	6	114	<u>+</u> 10	75
JAA	6	113	<u>+</u> 5	75
BASS	6	109	<u>+</u> 7	73
BAAIP	6	106	<u>+</u> 8	71
NEM	6	75	<u>+</u> 8	50
NCPM	6	86	<u>+</u> 9	57
pCMB	6	37	<u>+</u> 10	25
pCMBS	6	33	<u>+</u> 5	22
CPDS	6	95	<u>+</u> 9	63

liegt die Aktivität der Phosphatase bezogen auf die gleiche Zellzahl wesentlich niedriger als die ATP-ase Aktivität.

Abbildung 10 zeigt die pNPP-ase Aktivität von EAT-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit unter Normalbedingungen, mit einem Inhibitor und nach Neuraminidasebehandlung der Zellen (vgl. Abschnitt 3.9.b.).

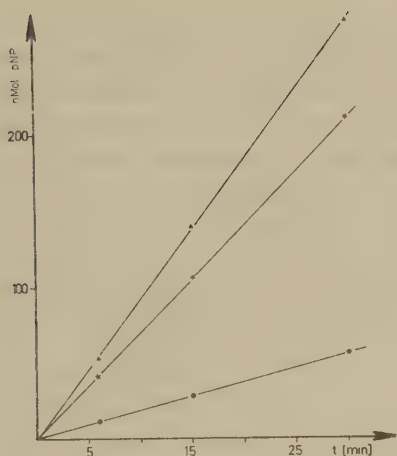


Abb. 10:

pNPP-ase Aktivität von
intakten EAT-Zellen in
Abhängigkeit von der
Inkubationszeit in
nMol pNP / 2×10^8 Zellen;
Puffer pH 7,3

- ★ normal
- + pCMB
- ▲ nach Einwirkung
von Neuramini-
dase

3.8.1. Diskussion

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-ase}$

Seitdem SKOU zum erstenmal 1957 [90] Na^+ und K^+ abhängige Adenosintriphosphat spaltende Enzymaktivitäten entdeckt hatte, wurden diese ATP-asen inzwischen in allen untersuchten tierischen Zellen membrangebunden nachgewiesen. Eingehende Untersuchungen zur Lokalisation, Charakterisierung und Isolierung der verschiedenen ATP-asen wurden vielfach mit den leicht präparierbaren Erythrozyten-ghosts durchgeführt. Es wird heute allgemein angenommen [86, 89], daß sich das ATP-ase aktive Protein asymmetrisch durch die Zellmembran erstreckt, wobei sich der eigentliche Ort der ATP-Apaltung und damit die Hauptfraktion des Enzyms an der Membraninnenseite befinden soll. Die einzelnen Fraktionen innerhalb der Zellmembran sind daher gegen Inhibitoren und Modifizierungsreagenzien unterschiedlich empfindlich. So

geben OKTA und MATSOMUTO [86] an, daß in Erythrozyten der Oubain sensitive Teil innen lokalisiert ist, während die durch SH-Blocker zu beeinflussende Aktivität zur Außenseite gerichtet ist. Als Hemmstoffe werden meist pCMB/S und NEM verwendet [85] aber es sind auch Untersuchungen mit Reagenzien zur Modifizierung von Carboxylgruppen bekannt [91]

Zur ATP-ase Aktivität der Asciteszellen liegen weitaus weniger Arbeiten vor. Einen Überblick vermitteln COLOMBINI und JOHNSONE [92]. Da Asciteszellen im Gegensatz zu Erythrozyten sehr schnell K^+ verlieren und Na^+ anreichern können, nahm man früher an, daß sich die ATP-ase der Asciteszelle möglicherweise von der in anderen Geweben unterscheidet. COLOMBINI berichtet aber, daß die Asciteszellen eine Na^+-K^+ -ATP-ase besitzen, deren Eigenschaften denen anderer Zellen ähnelt.

Das Ziel der eigenen Untersuchungen zu diesem Thema war, herauszufinden, ob es möglich ist, über Hemmversuche mit SH-Blockern einen Teil der Oberflächen SH-Gruppen enzymatischen Aktivitäten zuzuordnen.

Die ATP-ase-Aktivität ließ sich an dem verwendeten Zellstamm gut messen. Auffallend war, daß die Aktivitäten beschallter Zellen nur um 30 % höher lagen als die intakter Zellen. Wie der Tabelle 9 zu entnehmen ist, erwiesen sich alle verwendeten SH-blockierenden Reagenzien als schlechte Inhibitoren. Selbst NEM setzte die Aktivität nur um 20 % herab. Ähnlich wie bei den Oberflächen-SH-Gruppen, mit denen die Mercuriderivate kaum reagierten, erniedrigten beide Quecksilberverbindungen die ATP-ase Aktivität nur um 20 %. Für DTNB haben GODIN und SCHRIER [91] an ghosts schon bei niedrigeren Konzentrationen höhere Hemmeffekte gemessen; dasselbe Reagenz erniedrigte in unseren Experimenten die Aktivität der intakten EAT-Zellen nur um 10 %. Auch mit Ouabain war die ATP-ase Aktivität der Asciteszellen von außen wenig zu beeinflussen.

p-Nitrophenylphosphatase

Zur Messung der pNPP-ase Aktivität an lebenden intakten EAT-Zellen sowie zur Wirkung von SH-Reagenzien auf diese Aktivität liegen bisher keine Untersuchungen vor.

COLOMBINI [92] berichtet über die K^+ -Abhängigkeit einer pNPP-ase aus isolierten Ascites Plasmamembranen. Die Abhängigkeit von speziellen Ionen könnte auch für die in der vorliegenden Arbeit gemessenen niedrigen Aktivitäten in K^+ -freien Puffern verantwortlich sein.

Die beschriebene [92] spezifische Aktivität in einer Na^+ -freien Pufferlösung von: 100 nMol pNPP / h · mg Membranprotein liegt niedriger als die in eigenen Untersuchungen in Gegenwart von Na^+ ermittelte Aktivität, die sich von der Zellzahl auf Gesamtprotein als Bezugsgröße umrechnen läßt zu: 150 nMol pNPP / h · mg Protein.

Nach den Ergebnissen zur Hemmung der ATP-ase Aktivität wurde eine so starke Inhibierung der Phosphataseaktivität durch SH-Blocker nicht erwartet. Für die Effektivität der getesteten Reagenzien ließ sich folgende Reihe aufstellen:
pCMB/pCMBS > NEM/NCPM > CPDS > BAAIP/BASS/JAC/JAA

Die relative Resistenz der Ascites ATP-ase gegen SH-Reagenzien könnte man wie folgt erklären:

Entweder sitzen die für die Aktivität möglicherweise essentiellen SH-Gruppen schlecht erreichbar in der Membran oder an der zum Zellinneren gerichteten Seite, wogegen allerdings die Befunde mit NEM und pCMBS sprechen. NEM, das die Zellmembran von allen verwendeten Reagenzien am besten passiert, müßte innen mit den SH-Gruppen reagieren, und pCMBS sollte in den verwendeten Konzentrationen nach der bisherigen Erfahrung gar nicht in die Zelle hineingelangen; oder die fünfminütige Vorinkubation mit den Reagenzien hat nicht ausgereicht, um die SH-Gruppen zu blockieren. In Gegenwart des Substrats ATP könnten die

Agenzien an Wirksamkeit verloren haben, jedoch berichtet COLOMBINI [92] in diesem Zusammenhang, daß sich die Wirkung von DTNB auf die ATP-ase in Gegenwart von ATP verstärkt. Die dritte Möglichkeit wäre, daß diejenigen SH-Gruppen auf der Zelloberfläche, die nach unseren Ergebnissen durch die verwendeten Agenzien blockiert werden, für die Aktivität der ATP-ase nicht essentiell sind. Die vielfach beobachteten Wirkungen von Mercuriverbindungen können in der Hauptsache auf Veränderungen in der Membranstruktur, wie sie in Abschnitt 3.7.1. näher beschrieben sind, beruhen.

Nach den Ergebnissen der Phosphatasemessungen muß angenommen werden, daß diese Aktivität nahe der Zelloberfläche sitzt und für die Katalyse SH-Gruppen benötigt, da sie durch alle getesteten Reagenzien, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, inhibiert wird. Da auch BASS und BAAIP deutlich hemmen und auch Hemmeffekte des CPDS zu beobachten sind, liegt die Vermutung nahe, daß die Struktur des Inhibitormoleküls, also stereochemische Faktoren, eine nicht unerhebliche Rolle spielen. Im Hinblick auf das Substrat p-Nitrophenylphosphat wäre es denkbar, daß diese Inhibitoren und auch die Quecksilberverbindungen aufgrund des aromatischen Ringes als Substratanaloga gebunden werden. In diesem Zusammenhang wäre die Dithiodinitrobenzoesäure von ELLMAN [15] als Inhibitor sehr interessant gewesen, jedoch ließ sich wegen der mit dem pNP zusammenfallenden Absorption dieser Verbindung die spektroskopische Bestimmungsmethode nicht durchführen.

Die Messungen der Phosphataseaktivität nach Behandlung der Zellen mit Neuraminidase bestärken die Annahme, daß das Enzym an der Oberfläche sitzen muß. Nach Abspaltung der negativ geladenen Sialinsäurereste wurde das ebenfalls negativ geladene pNPP offensichtlich besser umgesetzt.

Die Ergebnisse der Versuche zur Inhibierung der ATP-ase und pNPP-ase stellen die essentielle Rolle der SH-Gruppen bei der Spaltung von exogen zugegebenem ATP durch die

intakte Asciteszelle stark in Frage. Man kann jedoch annehmen, daß ein kleiner Teil der Oberflächen-SH-Gruppen einer pNPP spaltenden Aktivität zuzuordnen ist. Wenn man das pH-Profil dieser Phosphatase ansieht, muß man allerdings zu dem Schluß kommen, daß sie bei physiologischen pH-Werten ein Aktivitätsminimum hat. Über die pNPP-ase als integraler Bestandteil der ATP-ase liegen bisher noch keine gesicherten Ergebnisse vor [89, 92].

3.9. Wirkung von Dithioerythrit und Neuraminidase auf Zahl und Reaktivität der Oberflächen-SH-Gruppen

a) Disulfidreduktion mit Dithioerythrit

Nach Inkubation der Zellen mit DTE und anschließender Entfernung des Reagenzes durch mehrmaliges Auswaschen wurde ein Anstieg der frei zugänglichen SH-Funktionen mit DTNB und CPDS gemessen. Die Meßwerte wiesen starke Streuungen auf.

Für DTNB: 133 $\pm$ 23 % (40 Bestimmungen)

Für CPDS: 130 $\pm$ 19 % (30 Bestimmungen)

Die Zahl der toten Zellen in den Ansätzen war gegenüber den Kontrollzellen für die überwiegende Mehrzahl der Versuche nicht erhöht.

b) Behandlung mit Neuraminidase

Die Voruntersuchungen sollten zunächst klären, wie lange die Zellen mit Neuraminidase inkubiert werden müssen, bis die Hauptmenge der N-Acetylneuraminsäure von der Zelloberfläche entfernt ist. Gleichzeitig wurde in diesen Ansätzen der Sialinsäuregehalt der Zelloberfläche quantitativ ermittelt.

Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Methode von WARREN [27] mit einer Modifizierung, wie sie von CASSIDY [29] angegeben wird. Für sehr niedrige Konzentrationen reichte das Ausschütteln der wässrigen Phase mit Butanol im Verhältnis 1 : 1 aus.

Der aus der Eichkurve für reine N-Acetylneuraminsäure ermittelte Extinktionskoeffizient betrug $4,17 \times 10^4$ L/Mol·cm. Den zeitlichen Verlauf der NANA-Abspaltung zeigt Abbildung 11.

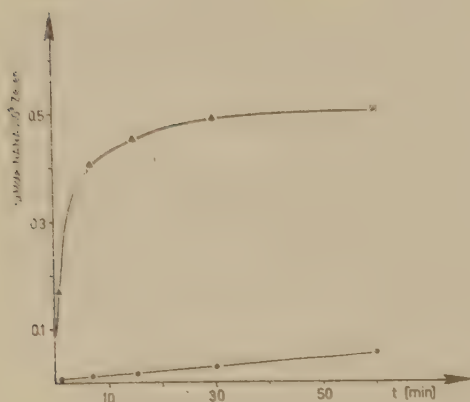


Abb. 11:

Abgespaltene Menge NANA in $\mu\text{Mol}/10^9$ Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Zellen mit Neuraminidase, 50 units

- ▲ + Neuraminidase
- Kontrollüberstand

Wie Abbildung 11 zu entnehmen ist, war der durch Neuraminidase innerhalb von 30 Minuten abspaltbare Sialinsäuregehalt der untersuchten Ascitesoberfläche

$$0,495 \pm 0,1 \mu\text{Mol} / 10^9 \text{ Zellen.}$$

Die Dichte der Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche (siehe auch Kapitel 3.1.a.) ergibt sich daraus mit:

$$3 \times 10^8 \text{ Sialinsäurereste} / \text{Zelle}$$

$$3,7 \text{ Sialinsäurereste} / 1000 \text{ } \lambda^2$$

Der Anteil toter Zeller betrug je nach Versuch für die Kontrolle als auch für die mit Neuraminidase behandelten Zellen innerhalb von 60 Minuten 15 - 20 %.

Zahl der SH-Gruppen nach Neuraminidase Einwirkung:

In den mit Neuraminidase behandelten Zellproben war die Anzahl der mit DTNB bestimmten SH-Gruppen auf der Zelloberfläche gegenüber den Kontrollzellen um 25 % ($\pm$ 19 %, 40 Bestimmungen) angestiegen.

3.9.1. Diskussion

Quantitative Bestimmung der Sialinsäure auf der Zelloberfläche

Es liegen zahlreiche Berichte zur Wirkung von Neuraminidase auf Asciteszellen vor [28, 93, 94, 95, 96]. Die leichte Verfügbarkeit großer Zellmengen, die durch einfaches Auswaschen von störenden Mucoproteinen befreit werden können, macht die Asciteszellen besonders geeignet für Studien über die negativen Ladungen auf der Tumorzelloberfläche. So ist die elektrophoretische Beweglichkeit [95] oder die Anlagerung positiv geladener Stoffe [93] nach Behandlung mit Neuraminidase gut untersucht. Eine Zusammenfassung zahlreicher Arbeiten über Sialinsäuren und Zell-Wechselwirkungen gibt WEISS [97]. Quantitative Angaben über den Sialinsäuregehalt der Membran fehlen in diesem Zusammenhang oft oder sind aufgrund der unterschiedlichen Bezugsgrößen (siehe 3.6.3.) nicht direkt mit eigenen Angaben zu vergleichen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Sialinsäurebestimmung nach WARREN wird als hochempfindliche Methode den Literaturangaben zufolge sehr häufig angewandt. Wie schon WARREN [27] berichtet, kann aber im Testansatz 2-Desoxyribose stören, da ihr Perjodatabbauprodukt mit Thiobarbitursäure eine bei 532 absorbierende Verbindung bildet. Beim Arbeiten mit Zellextrakten ist es daher notwendig, entweder die Meßproben vorzureinigen, wie in [98] beschrieben wird, oder die Ergebnisse mit den von

WARREN angegebenen Faktoren zu korrigieren.

Da in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen nur an intakten Zellen ausgeführt wurden, war nur mit sehr geringen Beimengungen von Desoxyzuckern infolge Zelllysis zu rechnen. So konnte auch bei 532 nm kein gesondertes Maximum festgestellt werden. Außerdem lief beim Test als Kontrollwert der Überstand von Zellen mit, die über die gleiche Zeitdauer nur mit Puffer inkubiert worden waren, so daß mögliche unspezifische Reaktionen mit Stoffen im Zellüberstand erfaßt wurden.

Der hier ermittelte Sialinsäureanteil der Asciteszelloberfläche von $0,49 \mu\text{Mol} / 10^9$ Zellen stimmt gut mit dem von HOELZL-WALLACH und EYLAR [96] angegebenen Gehalt von $0,42 \mu\text{Mol} / 10^9$ Zellen überein.

Auch die berechnete Dichte der Sialinsäurereste auf der Asciteszelloberfläche von 3,7 Resten pro $1000 \text{ \AA}^2$ stimmt mit Literaturangaben [33, 95] von 3,8 Resten pro $1000 \text{ \AA}^2$ überein.

Veränderte Eigenschaften der Zelloberfläche nach Abspaltung der Sialinsäure

Die von LANGLEY [28] und von COOK [95] vorgeschlagenen Inkubationszeiten von 90 bzw. 60 Minuten zur vollständigen Entfernung der Sialinsäure von EAT-Zellen wurden in eigenen Untersuchungen für zu lang befunden, da bereits nach 30 Minuten die gesamte Sialinsäure im Zellüberstand auftauchte. Im Hinblick auf sich anschließende weitere Untersuchungen schien ein 30-minütige Inkubationsdauer sinnvoll zu sein. Daß sich das lange Verweilen in Puffer und das Waschen auf die Zellen dennoch ungünstig auswirkt, kommt durch die große Fehlerbreite der anschließenden Bestimmung der SH-Funktionen zum Ausdruck. Für die beobachtete Erhöhung der Zahl der SH-Gruppen von 25 % nach Neuraminidasebehandlung gibt es zwei mögliche Erklärungen:

Entweder reagieren tatsächlich mehr SH-Reste mit dem Disulfid oder die Anzahl der reaktionsfähigen Gruppen ist die gleiche geblieben, reagiert aber infolge besserer Zugänglichkeit schneller, so daß das Ende der Reaktion eher erreicht wird. Da aber normalerweise die Umsetzung mit dem Disulfid nach 10 - 15 Minuten (siehe 3.2.1.e.) beendet ist, muß angenommen werden, daß die ermittelte Steigerung des SH-Gehaltes nicht auf einer schnelleren Reaktion basiert, sondern daß tatsächlich mehr SH-Gruppen für das Reagenz zugänglich waren.

Man kann allerdings im Augenblick noch keine Aussage darüber machen, ob allein durch die aufgelockerte Anionenbarriere mehr SH-Gruppen für das Reagenz erreichbar sind oder ob nicht die durch die Einwirkung des Enzyms bedingte Modifizierung der Glykokalyx Veränderungen in der Membranzstruktur verursacht hat und dadurch mehr SH-Gruppen nachweisbar waren. Vielleicht läßt sich die Streuung der Ergebnisse von hier aus am besten erklären.

Die für die SH-Gruppen angestellten Überlegungen könnten auch für die Steigerung der Phosphataseaktivität nach Neuraminidase Behandlung zutreffen. Die um 30 % erhöhte Aktivität kann sowohl auf einer erhöhten Exposition des Enzymproteins beruhen, als auch Folge einer leichteren Zugänglichkeit des Substrats für das Enzym nach Entfernung der negativ geladenen Sialinsäure sein.

Reduktion von Disulfiden der Zelloberfläche

Zur Disulfidreduktion an intakten Zelloberflächen gibt es bisher keine Literaturangaben. ANDO und STEINER berichten über die Behandlung von isolierten Thrombozyten-Membranen mit Dithioerythrit und anschließender Bestimmung der hinzugekommenen freien SH-Gruppen mit CPDS und DTNB [99].

Die Behandlung der Asciteszellen mit DTE war sehr problematisch. Verliefe die Inkubation über wenige Minuten, so war eine Erhöhung der SH-Gruppen nicht nachweisbar. Diese ließ sich erst feststellen, wenn über längere Zeit inkubiert wurde. Gleichzeitig erhöhte sich die Zahl der toten Zellen, bis schließlich starke Zelllysis eintrat. Über ähnliche Wirkungen von Cystein auf Mitochondrienmembranen berichtet EGUI [100]. Die beobachteten Effekte von Dithioerythrit beruhen aber sicherlich nicht allein auf Veränderungen in der Membranstruktur, sondern sind z.T. auf eine empfindliche Störung des SH/SS Verhältnisses in der Zelle zurückzuführen, da Dithioerythrit wahrscheinlich die Zellmembran passieren kann. Das Ausmaß dieser sekundären Veränderungen wäre besser kontrollierbar, wenn man zur Reduktion der Disulfidbrücken ein Reagenz zur Verfügung hätte, das die Zellmembran nur schwer durchdringt.

4. SCHLUSSBETRACHTUNG

Chemische und enzymatische Modifizierung von Membranen intakter Zellen

Unter den zahlreichen Arbeiten zur Aufklärung der molekularen Zusammensetzung der Zellmembrankomponenten, ihrer Verteilung und stereochemischen Anordnung, nehmen die Untersuchungen der Zelloberflächenmembran aufgrund ihrer herausragenden Besonderheit als Abgrenzungselement organisierter Zellsysteme gegen die Umgebung großen Raum ein. Die Anzahl der Experimente, die versuchen, einen Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der Membran an intakten, funktionstüchtigen Zellen herzustellen, sind darunter in der Minderzahl.

Um die Beteiligung von Zellmembranproteinen an den verschiedensten Vorgängen zu demonstrieren, hat man vielfach versucht, die beim Arbeiten mit Proteinen und Enzymen gewonnenen Erkenntnisse zur Inhibierung und Modifizierung von funktionellen Gruppen zu übertragen. Bevorzugtes Untersuchungsobjekt beim Arbeiten mit intakten Zellen sind die leicht zu handhabenden Erythrozyten, Lymphozyten, Leucozyten, Thrombozyten und bestimmte Tumoren als Typ einer einzelnen mit allen Organellen ausgestatteten Zelle.

Da die Anzahl der positiven Ladungen auf der Erythrozytenoberfläche sehr groß ist, sind die meisten Modifizierungsexperimente von NH_3^+ Gruppen an diesen Zellen ausgeführt worden. Verwendete Reagenzien sind Malein- [101] und Succinanhydrid [102], Citraconsäureanhydrid [33] und Isothiocyanostilben-disulfonsäure [103, 104]. Untersuchungen über Veränderungen der Zelloberfläche nach Behandlung mit Enzymen wie Trypsin, Neuraminidase, Pronase [28, 94], RNase [93], Subtilisin, Lysozym [105], Lactoperoxidase [106] und Phosphatase [107] wurden an allen genannten Zelltypen durchgeführt.

Da bei Tumorzellen bestimmte Proteine an der Oberfläche fehlen, liegen die endständigen Sialinsäurereste der Oligosaccharidketten der Glykokalyx frei; somit überwiegen die negativen Ladungen bei weitem [3, 97]. In den Arbeiten zur Auswirkung von Modifizierungen der negativen Ladungen auf die Funktion der Membran und den Zellstoffwechsel von Hepatoma- und Ascites-Tumorzellen werden neben spezifischen SH-Blockern wie pCMB, DTNB, NEM und JAC [108] auch andere unspezifische Reagenzien wie Acetaldehyd, Formaldehyd [95], Eisenhydroxid [93] genannt.

Wahl der Reagenzien für Modifizierungsexperimente an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Über die Behandlung von EAT-Zellen mit SH-Reagenzien hat die Arbeitsgruppe um GRASSETTI und MERISHI eine Anzahl von Mitteilungen gemacht [14, 30, 62, 63, 109], aus denen hervorgeht, daß bevorzugt solche Verbindungen eingesetzt wurden, die entweder nach dem Prinzip des Disulfidaustausches oder unter Mercaptidbildung reagieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Auswahl der Reagenzien davon ausgegangen, daß die Alkylierungsmittel und Maleinimide bisher bei Untersuchungen zur Charakterisierung der Zelloberflächenmembran wenig Verwendung gefunden haben, obwohl die bei der Reaktion entstehende stabile Thioätherbindung besonders interessante Aspekte eröffnet. Aus diesem Grund wurden neben bekannten SH-Blockern neue Verbindungen wie Bromacetylsulfanilsäure und Bromacetylaminoisophthalsäure angewendet neben dem bisher zu solchen Zwecken noch nicht verwendeten Mercurochrom und den an Asciteszellen noch nicht getesteten Verbindungen N-Carboxyphenylmaleinimid und Quecksilberphenyl-Azoferritin.

Vitalität der Zellen und Permeabilität der Zellmembran für Modifizierungsreagenzien

Die Problematik, die alle Modifizierungsexperimente an der Plasmamembran einer lebenden Zelle mit sich bringen, liegt klar auf der Hand. Erstens soll die Vitalität der Zellen so weit erhalten bleiben, daß noch Auswirkungen auf den Stoffwechsel und die Membranfunktion beurteilt werden können, und zweitens sollen die verwendeten Reagenzien nicht permeieren und zusätzliche Wirkung innerhalb der Zelle ausüben.

Für die Messung von Stoffwechselfparametern wurden die SH-Blocker daher so vorsichtig dosiert, daß die Zahl der toten Zellen im Laufe der 2. Passage in vitro möglichst wenig oder überhaupt nicht anstieg. Dieses Ziel konnte erwartungsgemäß nur zum Teil erreicht werden, insbesondere dann, wenn die Zellen oft zentrifugiert, resuspendiert und über längere Zeit im Puffer gehalten wurden. So wurde bei verschiedenen Experimenten der durchschnittlich ermittelte Prozentsatz toter Zellen mitangegeben, aber bei der Berechnung des gemessenen Parameters nicht berücksichtigt, weil die Vitalfärbung nur die anormale Durchlässigkeit der Zellmembran angibt, aber zum Beispiel nichts über verbliebene Restaktivität intrazellulärer oder membrangebundener Enzyme aussagt. Überhaupt kann man beim Studium der Literatur feststellen, daß die Erhaltung der Vitalität ein vielfach ungelöstes Problem ist [105, 106, 110].

Zum Permeationsverhalten der verwendeten Reagenzien kann zusammenfassend gesagt werden, daß alle Verbindungen, wenn auch in sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen, die Zellmembran passieren und ein Absterben der Zelle verursachen können. Im Falle des DTNB und CPDS wurden extrem hohe Konzentrationen nicht untersucht, woraus aber nicht der Eindruck entstehen darf, daß diese Reagenzien in entsprechender Konzentration sich nicht ebenso schädigend auf Membranfunktionen und Zellinneres auswirken könnten wie andere.

Wirkung von SH-Blockern auf die Plasmamembran und das Zellinnere

Die Effekte der Reagenzien BASS und BAAIP auf die freien SH-Gruppen der Membran waren nicht eindeutig zu interpretieren. So lief die erst bei hoher Konzentration beobachtete Abnahme des SH-Gehaltes parallel mit dem Eindringen der Stoffe in das Zellinnere. Andererseits wurde bereits bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen ein deutliches Absinken der Phosphataseaktivität beobachtet, wenngleich anzumerken ist, daß diese Experimente in Gegenwart der Inhibitoren ausgeführt wurden. Eine klare Abgrenzung zwischen den Auswirkungen der Blockierung von Oberflächenfunktionen und der Beeinflussung intrazellulärer Enzymaktivitäten ist daher anhand der durchgeführten Experimente nicht möglich.

Wenn man außerdem die durch Jodacetat und Jodacetamid erfolgte 30 - 40 %ige Blockierung der SH-Gruppen mit der 3 - 7 %igen Abnahme durch BASS und BAAIP vergleicht, wird deutlich, wie sehr die Reaktivität von der Natur des Reaktionspartners abhängt. Die hier auftretenden Unterschiede können nicht allein mit Abstoßungseffekten aufgrund der negativen Ladungen erklärt werden, da zur Bestimmung der übrigbleibenden SH-Funktionen ebenfalls Reagenzien verwendet wurden, die zweifach negativ geladen waren.

Es wäre in diesem Zusammenhang sehr aufschlußreich gewesen, ob die SH-Gruppen nach Auflockerung der Anionenbarriere durch Neuraminidasebehandlung nicht nur für das Nachweisreagenz Carboxypyridindisulfid zugänglicher geworden sind, sondern auch gegenüber den verschiedenen Alkylierungsmitteln ein anderes Verhalten gezeigt hätte. Da aber in einem solchen Experiment zur Entfernung der Reagenzien weitere Zentrifugationsschritte notwendig gewesen wären und die Vitalität durch das halbstündige Inkubationsverfahren in

Puffer sowieso schon beeinträchtigt war, wurde auf diese Untersuchungen verzichtet.

Fest steht, daß die Interpretation des Verhaltens der einzelnen Reagenzien gegenüber funktionellen Gruppen stark erschwert wird durch die äußerst komplexen sterischen Verhältnisse auf der Zelloberfläche, die auch durch die Anwesenheit anderer Stoffgruppen als Proteine bedingt sind.

Quecksilberhaltige SH-Reagenzien und native Zellen

Ob quecksilberorganische Reagenzien weitere Informationen zur Reaktivität von SH-Gruppen liefern können, war ein weiterer Punkt, der in der vorliegenden Arbeit geklärt werden sollte.

Es ist schon seit langem bekannt, daß Quecksilbersalze und manche organische Quecksilberverbindungen bereits in niedrigen Konzentrationen verheerende Auswirkungen auf lebendes Zellmaterial haben [111]. Trotzdem werden diese Reagenzien in zahlreichen Untersuchungen verwendet, um die Beteiligung von SH-Gruppen an Prozessen wie Glucose- und Ionentransport [75, 76] und ATP-Spaltung [86] zu studieren. Auch im Zusammenhang mit der Adhäsion von Zellen in Monolayer Kulturen [108], der Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten und anderen Blutzellen [112], werden SH-Gruppen diskutiert. Dabei werden die Ergebnisse, die aufgrund von Experimenten zur Inhibierung von SH-Gruppen mit quecksilberhaltigen Verbindungen gewonnen wurden, oft nicht mit der nötigen Vorsicht interpretiert. Es liegen allerdings auch Mitteilungen anderer Autoren vor, die sich sehr kritisch zur Verwendung dieser Reagenzien äußern [65, 85], gleichzeitig aber auch von der Verwendung des N-Äthylmaleinimids abraten. In Übereinstimmung damit wurde in eigenen Untersuchungen festgestellt, daß Mercuriverbindungen gravierende Auswirkungen auf die Membranen lebender Zellen haben und daß es schon bei geringer Dosierung zur

Ablösung von Membranbestandteilen, ja selbst zur Zellauf-
lösung kommen kann. EAT-Zellen, die mit quecksilberhaltigen
Verbindungen oder mit Maleinimiden behandelt worden waren,
ohne daß sich die Zahl der toten Zellen erhöhte, zeigten
bereits im Lichtmikroskop sichtbare morphologische Ver-
änderungen.

Zur Beantwortung der Frage, warum mit Mercuriverbindungen
diese extremen Effekte beobachtet werden, existieren bis-
lang nur Vermutungen. So nimmt FRIEDMAN [113] bei der
Wirkung von pCMB auf Proteine mit nicht frei zugänglichen
SH-Gruppen eine nicht kovalente Adsorption des Hg an bestimmte
Stellen des Proteins an. Dieser Vorgang bewirkt zunächst
eine Oberflächendenaturierung, anschließend eine Umlagerung
der nativen Proteinstruktur, so daß verborgene SH-Gruppen
exponiert werden und nun mit dem Agens reagieren können.
JOCELYN [114] zieht unter bestimmten Bedingungen eine
Spaltung von S-S-Brücken in Enzymen durch quecksilberhal-
tige Verbindungen in Betracht. Außerdem könnte man analog
dem für Enzyme und Proteine beobachteten intra- und inter-
molekularen "mercurial-transfer" [115, 116] eine Wanderung
der Reagenzreste von SH-Gruppe zu SH-Gruppe innerhalb der
Membranproteine annehmen, so daß deren Struktur in uner-
warteter Weise verändert wird.

Unspezifische Anlagerungs- und Wechselwirkungsprozesse bei
der Einwirkung von Quecksilberverbindungen auf Membran-
proteine, denen man in bisherigen Arbeiten mit intakten
Zellen zu wenig Beachtung geschenkt hat, sind für die Be-
urteilung und Interpretation solcher Versuche von er-
heblicher Bedeutung. Aus diesem Grund sind wir in der vor-
liegenden Arbeit zu dem Schluß gekommen, daß Quecksilber-
organische Verbindungen wegen ihrer unkontrollierbaren und
bisher zu wenig aufgeklärten zersetzenden und zerstörenden
Auswirkungen auf Membranen für das Arbeiten mit lebenden
Zellen kein qualifiziertes Mittel sind. Obwohl inzwischen
verschiedene Berichte über Untersuchungen mit dem hoch-
molekularen pCMB-Dextran-T-10 (MG 10 000) vorliegen

[86, 87] und auch in dieser Arbeit der Versuch gemacht wurde, das Ausmaß einer Blockierung von SH-Gruppen durch Reagenzien mit dem hochmolekularen Mercuroazoferritin im elektronenoptischen Bild sichtbar zu machen, scheinen auch diese Derivate nicht besonders geeignet zu sein, da sich die Dosierung dieser großen multifunktionellen Verbindungen weitaus schwieriger gestaltet als die der niedermolekularen Reagenzien.

Wirkung von Proteasen auf die Zelloberfläche

Wie schon vorher berichtet, werden die Zellen bei vielen Untersuchungen zur Struktur der Plasmamembran einer Trypsinbehandlung unterworfen [28, 94, 95]. In neueren Arbeiten [117] wird jedoch vielfach darauf hingewiesen, daß es bei diesem Verfahren häufig zur Abspaltung wesentlicher Membranbestandteile kommt und die Zahl der toten Zellen über die Maßen ansteigt. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Anwendung von Trypsin oder anderer proteolytischer Enzyme beim Studium der SH-Gruppen auf der Oberfläche intakter EAT-Zellen verzichtet.

Zuverlässigkeit der GRASSETTI-Methode

Wenn man die Wirkungen der verwendeten Reagenzien auf die SH-Gruppen der Zelloberfläche und auf die ATP-ase bzw. Phosphatase Aktivität vergleicht, fällt auf, daß die SH-Gruppen durch einige Reagenzien kaum blockiert werden, die Enzymaktivitäten aber deutlich verändert sind. Das Reagenz pCMBS zum Beispiel, für das die Membran der Asciteszelle unter den gewählten Bedingungen impermeabel ist, reagiert scheinbar nicht mit den Oberflächen-SH-Gruppen, inhibiert aber stark die p-Nitrophenylphosphatase Aktivität der Plasmamembran. Diese Ergebnisse und die vorher erwähnten Befunde mit BASS und BAAIP werfen die Frage auf, ob sich die SH-Gruppen überhaupt als Parameter zur Untersuchung der Ausprägung der Zelloberfläche eignen.

Eine Antwort darauf läßt sich nicht unabhängig von den zur Verfügung stehenden Methoden geben. So wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, das auf einer Disulfidaustauschreaktion und anschließender Reduktion des gemischten Disulfids beruhende GRASSETTI-Verfahren zur SH-Gruppen Bestimmung durch sorgfältiges, zeit- und temperaturkonstantes Arbeiten zu standardisieren. Wenn sich auch Carboxypyridindisulfid (GRASSETTI-Reagenz) und Dithionitnitrobenzoesäure (ELLMAN-Reagenz) für isolierte Membranen, z.B. Thrombozyten [118] bewährt haben, so zeigen die Meßergebnisse der Experimente mit lebenden Zellen sowohl bei GRASSETTI [14] als auch in der eigenen Arbeit große Schwankungen. Die sorgfältige Analyse der einzelnen Teilschritte dieser Methode läßt den Schluß zu, daß während des gesamten Versuchs eine spontane Reduktion des gemischten Disulfids an der Zelloberfläche stattfindet. Da das Glutathion aus lysierten Zellen nicht ausreicht, um alle Disulfidbrücken zu spalten, wird angenommen, daß die betroffene Zelle selbst ihre blockierten Oberflächen-SH-Gruppen wieder in den freien, reaktiven Zustand bringt.

Die Untersuchungen zur Disulfid spaltenden Kapazität der intakten Asciteszellen, wobei die Zelloberfläche als Ort des Reaktionsablaufes diskutiert wird, bestärken die Vermutung, daß die Reduktion des mit CPDS oder DTNB gebildeten Disulfids durch zelleigene SH-Gruppen geschieht. Da sich nach den bisherigen Kenntnissen über die Zelloberfläche nicht beantworten läßt, ob es sich bei diesem Vorgang um eine Sekundärreaktion handelt, während der Proteinbestandteile aus inneren Membranbezirken an die Oberfläche gelangen oder ob interzelluläre z.T. enzymatische Prozesse beteiligt sein können, wie sie für das Galactosyl-Transferase-System angenommen werden [3], müssen alle weiteren Interpretationen dieser Befunde hypothetischen Charakter haben.

Es kann aber aus den durchgeführten Experimenten der Schluß gezogen werden, daß vom Zeitpunkt der Inkubation der Zellen mit den Disulfiden bis zur Abspaltung des Thions durch Cystein oder Glutathion Prozesse an der Oberfläche ablaufen, die das Ergebnis der Messungen in jedem Fall beeinträchtigen müssen.

So dürfte die Bestimmung kleinerer Differenzen in der Zahl der SH-Gruppen nach metabolischen Zustandsänderungen große Schwierigkeiten bereiten oder nur aufgrund einer Vielzahl von Einzelmessungen möglich sein. Hinzu kommt, daß für einen einzigen Meßwert mindestens 10^8 Zellen nötig sind, um noch in einen photometrisch auswertbaren Bereich zu gelangen. Für Untersuchungen, wie z.B. zur Feststellung der Veränderung der Zelloberfläche während des Zellzyklus, wo im allgemeinen nur sehr wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht oder für routinemäßige Überprüfungen, ist diese Form der Bestimmung ungeeignet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aufgrund der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden zur Erfassung der Anzahl der Oberflächen-SH-Gruppen, die eingangs gestellte Frage, ob die SH-Gruppen einen geeigneten Parameter zur Untersuchung der chemischen Ausprägung der Zelloberfläche darstellen, nicht bejaht werden kann.

Alternative Möglichkeiten zur Untersuchung der Ausprägung der Zelloberfläche

Die von GRASSETTI eingeführte spektroskopische Methode zur Erfassung freier SH-Gruppen an nativen Zelloberflächen hat sich als nicht ausreichend empfindlich erwiesen. Außerdem kann die reversible Blockierung der SH-Gruppen, auf der diese Methode basiert, an der Oberfläche nativer, stoffwechselaktiver Zellen niemals vollständig erreicht werden. Zur quantitativen Bestimmung wäre demnach ein Verfahren geeignet, bei dem die Oberflächen-SH-Gruppen irreversibel blockiert werden und das in der Empfindlichkeit

um ein Vielfaches gesteigert ist. Diese Voraussetzungen würden z.B. isotopenmarkierte Alkylierungsmittel erfüllen. Auf jeden Fall müßten aber solche Verbindungen ausgewählt werden, die innerhalb eines größeren Zeitraumes die Plasmamembran garantiert nicht passieren.

Die vorliegenden Erfahrungen zum Verhalten membrangebundener Enzyme gegenüber SH-blockierenden Reagenzien könnten der Anlaß für weitere Untersuchungen mit dem Ziel sein, zu klären, ob nicht diese oder andere enzymatische Aktivitäten vielleicht ein empfindlicheres Maß für die momentane Ausprägung der Zelloberfläche darstellen als die mit den bisherigen Methoden meßbare Reaktivität von funktionellen Gruppen gegenüber chemischen Nachweisreagenzien.

Die zur Messung von Enzymaktivitäten erforderlichen geringen Zellmengen sind für derartige Untersuchungen von großem Vorteil.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die bisherigen Kenntnisse über Reaktivität, Zahl und Funktion protein-gebundener SH-Gruppen der Plasmamembran am Beispiel der lebenden Ehrlich-Ascites-Tumorzelle zu erweitern.

1. Als Untersuchungsobjekt dienten entweder Zellen, die unmittelbar dem Ascites-Tumor einer Maus entnommen wurden oder aus der 2. Passage einer in vitro Zellkultur stammten.
2. Die Bestimmung der Anzahl der SH-Gruppen auf der Zelloberfläche über Disulfidaustauschreaktionen mit Carboxypyridindisulfid (GRASSETTI-Reagenz) oder Dithiodinitrobenzoesäure (ELLMAN-Reagenz) ergab 3×10^3 SH-Gruppen pro Zelle und liegt damit um den Faktor sechs höher als die Literaturangaben. Die Ursachen dieser Differenz wurden eingehend untersucht. Dabei wurde der Einfluß von Temperatur, Glucosegehalt des Puffers und Inkubationszeit besonders berücksichtigt.
3. Eingriffe in die Oberflächenstruktur der Zelle durch enzymatische Abspaltung der Sialinsäure und chemische Reduktion von Disulfidbrücken mit Dithioerythrit verursachten Veränderungen in Zahl und Zugänglichkeit der SH-Gruppen. Neben einer Erhöhung der Anzahl der SH-Gruppen mit beiden Methoden wurde nach Neuraminidasebehandlung auch eine Erhöhung der p-Nitrophenylphosphatase Aktivität beobachtet.
4. Die Bestimmung der Anzahl der SH-Gruppen nach Einwirkung von Alkylierungsmitteln verschiedenster Struktur (α -Halogenacylderivate, Maleinimide) auf lebende Zellen zeigt, daß diese bereits mit SH-Gruppen der Zelloberfläche reagieren, bevor sie in das Zellinnere

eindringen. Ein Effekt der quecksilberorganischen Verbindungen auf die Anzahl der SH-Gruppen der Zelloberfläche war kaum festzustellen. Dies wird auf sekundäre Umorientierungen von Membrankomponenten unter Einfluß von Quecksilberverbindungen zurückgeführt, die die Anzahl der SH-Gruppen scheinbar ansteigen lassen. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen grundsätzliche Bedenken gegen die Verwendung von quecksilberhaltigen SH-Blockern beim Arbeiten mit lebenden Zellen auf.

5. Die Aktivität der in die Membran integrierten Enzymsysteme wird durch alle verwendeten Disulfidverbindungen, Maleinimide und Alkylierungsmittel deutlich beeinflusst, wobei die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP-ase weitaus weniger betroffen war als die saure Phosphatase. Die stärksten Hemmeffekte wurden mit Mercuriverbindungen beobachtet.
6. SH-Gruppen der Zelloberfläche reagieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit mit Disulfiden der verschiedensten Struktur unabhängig davon, ob diese Verbindungen in lebenden Zellen normalerweise vorkommen. Die Beteiligung von Pyridinnukleotid abhängigen Reduktasen und Transhydrogenasen an der Reaktion konnte nicht nachgewiesen werden.
7. Die Auswirkungen der Alkylierung von Membran-SH-Gruppen auf den Stoffwechsel lassen sich in der Interpretation nur schwer von den Effekten trennen, die infolge einer Permeation der SH-Blocker durch die Membran im Zellinneren auftreten. Es wird gezeigt, daß der intrazelluläre Nicht-Protein-SH Spiegel ein zuverlässiger Parameter für eingedrungene SH-Reagenzien ist, daß aber die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase Aktivität einen noch empfindlicheren Indikator für diesen Vorgang darstellt.

Die an Zellen in Kultur gemessenen Stoffwechselfparameter (Lactatproduktion, ^{14}C -Thymidin- und ^{14}C -Uridin-Einbau, ^{14}C - α -Aminoisobuttersäure-Transport, Atmung, Na^+ - K^+ -Spiegel) wurden durch SH-Reagenzien in Konzentrationen, die die Vitalität der Zellen nicht beeinträchtigten, in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. Nur bei nicht erhöhter Totzahl trat nach einer Erholungsphase eine Normalisierung der Stoffwechselleistungen ein.

8. Die Prüfung der Frage, ob die Zahl der SH-Gruppen überhaupt ein geeigneter Parameter zur Verfolgung der chemischen Ausprägung der Zelloberfläche unter verschiedenen Bedingungen darstellt, führte zu folgenden Ergebnissen:
- Die quantitative Bestimmung der Anzahl der SH-Gruppen über die Disulfidaustauschreaktion und anschließende Reduktion des gemischten Disulfids mit niedermolekularen Mercaptanen läßt sich bis zu einem bestimmten Grad standardisieren, weist jedoch eine extrem große Fehlerbreite auf.
 - Dies wird aufgrund eingehender Untersuchungen auf eine spontane Reduktion des gemischten Disulfids durch die Zelle selbst und durch anwesendes lysiertes Zellmaterial zurückgeführt.
 - Um zu ausreichend verlässlichen Ergebnissen mit dieser Methode zu kommen, müssen mindestens 10^8 Zellen pro Meßwert verwendet werden.
 - Zur Bestimmung des Zustandes der Zelloberfläche im Rahmen von Untersuchungen, für die nur wenig Zellmaterial zur Verfügung steht (z.B. beim Arbeiten mit synchronisierten Zellen), eignet sich diese Methode daher nicht.
- Außerdem reicht ihre Genauigkeit zur Feststellung von kleinen Änderungen im Zustand der Zellmembran nicht aus.

9. Wahrscheinlich stellen Enzymaktivitäten der Zelloberfläche einen empfindlicheren Parameter für die Ausprägung der Plasmamembran dar als die mit bisher bekannten Methoden meßbare Reaktivität von SH-Gruppen gegenüber chemischen Nachweisreagenzien.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Coleman und J.B. Finean
in: Comprehensive Biochemistry (M.Florkin, E.H. Stotz,
eds.) Vol. 23, p. 99-126 Elsevier Publ.Comp., Amster-
dam (1968)
- [2] F.O. Schmitt
in: The Dynamic Structure of Cell Membranes
22. Colloquium der Gesellschaft für Biol. Chemie
S. 5-37 (1971)
- [3] P. Emmelot
Eur. J. Cancer 9, 319-333 (1973)
- [4] S.J. Singer und G.L. Nicolson
Science 175, 720-731 (1973)
- [5] A.R. Oseroff, D.W. Robbins, M.M. Burger
in: Annual Review of Biochemistry (E.E. Snell, ed.)
Vol. 42, p. 647-682, Annual Reviews Inc. (1973)
- [6] K. Karzel und J. Schmid
Arzneimittelforschung 18, 1500-1504 (1968)
- [7] R. Schindler, M. Day und G.A. Fischer
Cancer Res. 19, 47-51 (1959)
- [8] H.P. Krause
Biochem. Dissertation, Marburg (1973)
- [9] J. Málek
in: Manometrische Methoden (A. Kleinzeller, Hrsg.)
S. 278-281 Fischer Verlag, Jena (1965)
- [10] U. Wurster
Biochem. Diplomarbeit, Tübingen (1970)
- [11] J.P. Kaltenbach, M.H. Kaltenbach und W.B. Lyons
Exp. Cell. Res. 15, 112-117 (1958)
- [12] J.L. Bailey
Techniques in Protein Chemistry
Elsevier, Amsterdam, London, New York (1967)

- [13] D. Petz
Chemische Diplomarbeit, Marburg (1971)
- [14] D.R. Grassetti und J.F. Murray jr.
Biochem. Pharm. 19, 1836-1838 (1969)
- [15] G.L. Ellman
Arch.Biochem.Biophys. 82, 70-77 (1959)
- [16] E. Beutler
in: Glutathione (L. Flohé, H.Ch. Benöhr, H.Sies,
H.D. Waller, A. Wendel, eds.) p. 109-113
Georg Thieme Publishers, Stuttgart (1974)
- [17] H.U. Bergmeyer, K. Gawehn und M. Graßl
in: Methoden der Enzymatischen Analyse (H.U. Berg-
meyer, Hrsg.) S. 424-425 Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- [18] E. Bernt und H.U. Bergmeyer
in: l.c. [17], S. 1605-1609
- [19] W.W. Kay und K.C. Murfitt
Biochem. J. 74, 203-208 (1960)
- [20] H.U. Bergmeyer, K.Gawehn und M. Graßl
in: l.c. [17], S. 425-426
- [21] S.J. Singer
Nature 183, 1523-1524 (1959)
- [22] W. Hasselbach und L.G. Elfin
J. Ultrastr. Res. 17, 598-622 (1967)
- [23] J.H. Phillips, A.St. Robrish und C. Bates
J.Biol. Chem. 240, 699-704 (1964)
- [24] H. Eibl und W.E.M. Lands
Anal. Biochem. 30, 51-57 (1969)
- [25] L.S. Bonting, K.A. Simon, N.M. Hawkins
Arch. Biochem. Biophys. 95, 416-423 (1961)
- [26] V.P. Hollander
in: The Enzymes (P.D. Boyer ed.) Vol. IV, p. 449-498,
Academic Press, New York (1971)

- [27] L. Warren
J. Biol. Chem. 234, 1971-1975 (1959)
- [28] O.K. Langley und E.J. Ambrose
Biochem. J. 102, 367-372 (1967)
- [29] T.J. Cassidy, G.W. Jourdian und S. Roseman
in: Methods in Enzymology (E.F. Neufeld, V. Ginsburg,
eds.) Academic Press, New York, Vol. VIII, p. 680-685
(1966)
- [30] J.N. Merishi und D.R. Grassetti
Nature 224, 563-564 (1969)
- [31] F.W. Küster, A. Thiel und K. Fischbeck
Logarithmische Rechentafeln, de Gruyter Verlag, Berlin
(1969)
- [32] D.R. Grassetti, J.F. Murray und H.T. Ruan
Biochem. Pharm. 18, 603-611 (1969)
- [33] J.N. Merishi
in: Progress in Biophysics and Molecular Biology
Vol. 25, p. 1-70, Pergamon Press Oxford (1972)
- [34] D.R. Grassetti
Ann. I st. Super. Sanità 5, 645-651 (1969)
- [35] Y. Ando und M. Steiner
Biochim. Biophys. Acta 311, 26-37 (1973)
- [36] A. Fredborg und P.E. Lindahl
Exp. Cell Res. 59, 452-456 (1970)
- [37] S. Hosoda und W. Nakamura
Biochim. Biophys. Acta 222, 53-64 (1970)
- [38] E. Knox
in: l.c. [26] Vol. 2, p. 253-294 (1960)
- [39] L. Eldjarn und J. Bremer
Biochem. J. 84, 286-291 (1962)
- [40] A. Phil und L. Eldjarn
in: Proc. 4th Int. Congress of Biochemistry, Vienna
13, 43-62 (1958)

- [41] P.C. Jocelyn
Biochemistry of the SH-group, Academic Press, London
p. 323-332 (1972)
- [42] Z.M. Bacq und P. Alexander
Nature 203, 162-165 (1964)
- [43] P.C. Jocelyn
l.c. [41] p. 190-200
- [44] F. Tietze
Biochim. Biophys. Acta 220, 449-462 (1970)
- [45] E. Racker
J. Biol. Chem. 217, 867-874 (1955)
- [46] M.L. Chandler und P.T. Varandani
Biochim. Biophys. Acta 286, 136-145 (1972)
- [47] H.M. Katzen und F. Tietze
J. Biol. Chem. 241, 3561-3570 (1966)
- [48] R.N. Ordazara und R. Abney
FEBS-Lett. 7, 227-230 (1970)
- [49] J. Zamudio, M. Cellino und M. Canessa-Fischer
Arch. Biochem. Biophys. 129, 336-345 (1969)
- [50] F. Tietze
Arch. Biochem. Biophys. 138, 177-188 (1970)
- [51] S. Nagai und S. Black
J. Biol. Chem. 243, 1942-1947 (1968)
- [52] L. Eldjarn, J. Bremer und H.C. Børresen
Biochem. J. 82, 192-197 (1962)
- [53] H. Modig
Biochem. Pharm. 17, 177-186 (1967)
- [54] A. Schöberl
Fette, Seifen, Anstrichmittel 64, 250-254 (1962)

- [55] D.R. Grassetti, J.F. Murray jr., M.E. Brokke
und A.D. Gutman
J. Med. Chem. 10, 1170-1173 (1967)
- [56] D.R. Grassetti, M.E. Brokke und J.F. Murray jr.
J. Med. Chem. 8, 753-756 (1965)
- [57] D.R. Grassetti und J.F. Murray jr.
Arch. Biochem. Biophys. 119, 41-49 (1967)
- [58] T. Sekine
Anal. Biochem. 48, 557-568 (1972)
- [59] S.R. Simon, D.J. Arndt und W.H. Konigsberg
J. Mol. Biol. 58, 69-77 (1971)
- [60] R.P.P. Smith und G.L. Ellman
J. Membr. Biol. 12, 177-188 (1973)
- [61] D.R. Grassetti
Nature 228, 282-283 (1970)
- [62] D.R. Grassetti und J.F. Murray jr.
Biochem. Pharm. 16, 2387-2393 (1967)
- [63] D.R. Grassetti und J.F. Murray jr.
Biochem. Pharm. 17, 2281-2290 (1968)
- [64] D.T. Poole, T.C. Butler und M.E. Williams
Biochem. Pharm. 22, 1893-1904 (1973)
- [65] J.R. Carter
Biochemistry 12, 171-176 (1973)
- [66] F. Fleming, J.N. Merishi und J.A.F. Napier
Int. J. Radiat. Biol. 14, 175-186 (1968)
- [67] H. Passow und A. Rothstein
J. Gen. Physiol. 43, 621-633 (1960)
- [68] M. Maizels, M. Remington und R. Truscose
J. Physiol. 140, 48-60 (1958)

- [69] W.V. Greenhouse und E.L. Coe
Biochim. Biophys. Acta 329, 183-195 (1973)
- [70] National Formulary, Vol. VIII, p. 321-325,
American Pharmaceutical Association, Washington (1946)
- [71] J.W. Harris und H.M. Patt
Exp. Cell Res. 56, 134-141 (1969)
- [72] L. Révész, H. Bergstrand und H. Modig
Nature 198, 1275-1277 (1963)
- [73] M. Gronow
Int. J. Rad. Biol. 9, 123-132 (1964)
- [74] J.W. Harris
Exp. Cell Res. 50, 293-304 (1969)
- [75] R.C. Jackson, K.R. Harrap und C.A. Smith
Biochem. J. 110, 37p (1968)
- [76] E. Beutler, O. Duron und B.M. Kelly
J. Lab. clin. Med. 61, 882-888 (1963)
- [77] J. Vanstevenick, R.J. Weed und A. Rothstein
J. Gen. Physiol. 48, 617-632 (1965)
- [78] R.M. Sutherland, A. Rothstein und R.J. Weed
J. Cell. Physiol. 69, 185-198 (1967)
- [79] J. Harris, B.P. Meriwether und J.H. Park
Nature 198, 154-157 (1963)
- [80] R.L. Juliano
Biochim. Biophys. Acta 300, 341-378 (1973)
- [81] W. Thoenes und K.H. Langer
Virchow's Arch. Abt. B Zellpath. 2, 361-379 (1969)
- [82] J.L. Webb
Enzyme and Metabolic Inhibitors Vol. III
Academic Press, New York (1965)
- [83] G. Sauermann
Biochim. Biophys. Acta 118, 268-275 (1966)

- [84] N. Tanaka, M. Urano, Y. Saeki und T. Etoh
Nippon Acta Radiol. 30, 6-11 (1970)
- [85] D.A. Godin und S.L. Schrier
J. Membr. Biol. 7, 285-312 (1972)
- [86] H. Okta, J. Matsomuto, K. Nagano, M. Fujita, M. Nakao
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1127-1134 (1971)
- [87] V. Wizenman, J. Schulz und B. Simon
Biochim. Biophys. Acta 307, 366-371 (1973)
- [88] D.A.T. Dick, E.G. Dick und D.C. Tosteson
J. Gen. Physiol. 54, 123-133 (1969)
- [89] M. Nakao und K. Nagano
in: Molecular Mechanism of Enzyme Action
NRJ Symposia on Modern Biology
(Y. Ogura, Y. Tanomura, T. Nakamura, eds.) p. 297-312
University Park Press, Baltimore (1972)
- [90] J.C. Skou
Biochim. Biophys. Acta 23, 394-401 (1957)
- [91] D.V. Godin und S.L. Schrier
Biochemistry 9, 4068-4077 (1970)
- [92] M. Colombini und R.M. Johnstone
Biochim. Biophys. Acta 323, 69-86 (1973)
- [93] L. Weiss und R. Zeigl
J. Cell. Physiol. 77, 179-186 (1970)
- [94] E. Mayhew und R. Juliano
Exp. Cell Res. 77, 409-414 (1973)
- [95] G.M.W. Cook, D.H. Heard und G.V.F. Seaman
Exp. Cell Res. 28, 27-39 (1962)
- [96] D.F. Hoelzl-Wallach und E.H. Eylar
Biochim. Biophys. Acta 52, 594-596 (1961)
- [97] L. Weiss
J. Nat. Canc. Inst. 50, 3-19 (1973)

- [98] P. MacQuiddy und J. Lilien
J.Cell Sci. 9, 823-833 (1971)
- [99] Y. Ando und M. Steiner
Biochim. Biophys. Acta 311, 38-44 (1973)
- [100] J. Eugui und E. Santiago
Rev. Med. Univ. Navarra 15, 285-295 (1971)
- [101] A.L. Obaid, A. Rega
J.Membr. Biol. 9, 385-401 (1972)
- [102] R. Brossmer, B. Bohn und W. Brandeis
FEBS Lett. 35, 195-197 (1973)
- [103] P.A. Knauf und A. Rothstein
J. Gen. Physiol. 58, 190-210 (1971)
- [104] P.A. Knauf und A. Rothstein
l.c. [103], 211-223
- [105] R. Brossmer, W. Brandeis und K. Kramps
Z. Physiol. Chem. 349, 1241-1242 (1968)
- [106] A.L. Hubbard und Z.A. Cohn
J. Cell Biol. 55, 390-405 (1972)
- [107] J.N. Merishi
Nature 226, 452-453 (1970)
- [108] F. Grinnell und P.A. Srere
J.Cell.Physiol. 78, 153-158 (1971)
- [109] J.N. Merishi und A.E. Butterworth
Europ. J. Cancer 5, 5-14 (1969)
- [110] R. Brossmer, B. Bohn und H. Schlicker
FEBS Lett. 35, 191-194 (1973)
- [111] J.L. Webb
l.c. [82], Vol. II
- [112] G.F. Giordano und M.A. Lichtman
J. Cell.Physiol. 82, 387-395 (1973)

[113] M. Friedman

The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl
Group in Amino Acids, Peptides and Proteins
p. 320-321, Pergamon Press, Oxford (1973)

[114] P.C. Jocelyn

l.c. [41], p. 118

[115] L. Casola und V. Massay

J. Biol. Chem. 241, 4985-4993 (1966)

[116] T. Nakata und K. Yagi

J. Biochem. Tokyo 66, 409-412 (1969)

LEBENS LAUF

- 22.8.1944 geboren in Gleiwitz/OS als 2. Kind
des Technischen Kaufmanns Benno Kail
und seiner Frau Kornelia, geb. Cedzich
- 1951 - 1955 Besuch der Overbergsschule Lüdenscheid
- 1955 - 1964 Besuch des Neusprachlichen-Mädchen-
Gymnasiums Lüdenscheid
- Februar 1964 dort Ablegung der Reifeprüfung
- SS 1964 - Studium der Physiologischen Chemie und
SS 1970 Biochemie an der Eberhard-Karls-Uni-
versität Tübingen
- April 1965 Vordiplom I
- Oktober 1967 Vordiplom II
- November 1969 Diplom-Hauptprüfung
- Dezember 1969 Diplomarbeit am Physiologisch-chemischen
- Juli 1970 Institut der Universität Tübingen unter
Anleitung von Prof. Dr. Fr. Schneider
über die SH-Protease Papain
- Seit Oktober beschäftigt am Physiologisch-chemischen
1970 Institut II der Philipps-Universität
Marburg
- Mai 1971 - Dissertation unter der Anleitung von
März 1974 Prof. Dr. Fr. Schneider über die Plasma-
membran der Ehrlich-Ascites-Tumorzelle

